

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CARACTERIZACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE  
LA PROTEÍNA APRIL  
EN EL CÁNCER DE MAMA

TESIS DOCTORAL

ARACELI GARCÍA CASTRO

Licenciada en Biología





El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en  
el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro  
Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección  
de la doctora Lourdes Planelles Carazo



Queda prohibido no sonreír a los problemas,  
no luchar por lo que quieres,  
abandonarlo todo por miedo,  
no convertir en realidad tus sueños...

Pablo Neruda



# **ÍNDICE**



<b>ABREVIATURAS</b> .....	19
<b>SUMMARY</b> .....	29
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	33
1- La familia del factor de necrosis tumoral (TNF) .....	35
2- APRIL y BAFF .....	35
3- Estructura y procesamiento de APRIL .....	36
3.1- Estructura del gen que codifica para APRIL.....	36
3.2- Estructura y procesamiento de la proteína APRIL .....	37
4- Expresión de APRIL .....	38
5- Receptores de APRIL .....	39
5.1- Receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNFR).....	39
5.1.1- TACI.....	39
5.1.2- BCMA .....	40
5.2- Proteoglicanos heparán sulfato (PGHS).....	41
6- Funciones de APRIL.....	43
6.1- Modelos animales para el estudio de APRIL y sus receptores .....	44
6.2- APRIL en enfermedades autoinmunes .....	46
6.3- APRIL en cáncer .....	47
6.3.1- Tumores de origen hematopoyético .....	48
6.3.2- APRIL en tumores sólidos .....	51
7- El cáncer de mama .....	53
7.1- MAPKs y cáncer de mama.....	55
7.2- Clasificación del cáncer de mama.....	55
7.3- Modelos animales para el estudio del cáncer de mama .....	57
<b>OBJETIVOS</b> .....	61
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	65
1- Líneas celulares .....	67
2- Estimulación de células con APRIL recombinante o ligandos TLR .....	67
3- Estimulación de células con APRIL para estudiar la señalización celular .....	68
4- Transfección con ARNi .....	68
5- Preparación de lisados celulares para western blot .....	68
6- Western blot .....	69

7- ELISA de APRIL .....	70
8- Inmunofluorescencia.....	70
9- Citometría de flujo (preparación y tinción de muestras) .....	71
10- Ensayo de viabilidad celular con MTS .....	72
11- Medida de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada .....	73
12- Medida de proliferación en presencia de los inhibidores de MAPKs y PI3K .....	73
13- Extracción y aislamiento de ARN.....	74
14- Retrotranscripción.....	74
15- RT-PCR.....	74
16- Muestras humanas utilizadas para inmunohistoquímica.....	75
17- Inmunohistoquímica .....	75
18- Análisis y cuantificación de las imágenes de IHQ .....	76
19- Obtención de ADN genómico a partir de colas de ratón .....	77
20- PCRs para el genotipado de las distintas cepas de ratones .....	77
21- Cepas de ratones .....	78
21.1- Generación de ratones MMTV-neu/APRIL transgénicos.....	78
21.2- Generación de ratones APRIL-KO en fondo BALB/c .....	78
21.3- Generación de ratones APRIL-KO/ MMTV-neu en fondo BALB/c .....	79
22- Modelos tumorales.....	80
22.1- Modelo de tumores de mama espontáneos MMTV-neu. Medición de tumores y sacrificio. ....	80
22.1.1- Procesamiento del tumor .....	81
22.2- Modelo de ortotransplantes de células 4T-1. Medición de tumores y sacrificio. ....	81
22.2.1- Procesamiento del tumor .....	81
22.2.2- Procesamiento del nódulo linfático .....	82
22.2.3- Procesamiento del pulmón_ .....	82
23- Análisis estadístico.....	82
ANEXO I: Composición de tampones y soluciones utilizados.....	85
<b>RESULTADOS</b> .....	89
1- Análisis de la expresión de APRIL y sus receptores, BCMA y TACI en líneas celulares de cáncer de mama humanas .....	91
1.1- APRIL se expresa en líneas celulares de cáncer de mama.....	91
1.2- Un ligando de la familia de los TLR, pIC, modula la expresión y aumenta la secreción de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama humanas .....	94
1.3- Los receptores de APRIL, BCMA y TACI, se expresan en líneas celulares de cáncer de mama humanas .....	96



2- Análisis de la función de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama .....	97
2.1- APRIL favorece la proliferación celular .....	97
2.2- APRIL media la proliferación celular a través de BCMA y/o TACI en células de cáncer de mama humanas.....	100
3- Análisis de las vías de señalización activadas por APRIL en líneas celulares de cáncer de mama.....	101
3.1- APRIL activa las rutas de señalización de AKT, así como de las MAPKs p38 y ERK.....	101
3.2- APRIL promueve la proliferación celular a través de ERK1/2 y p38.....	102
4- Caracterización de la función de APRIL en modelos murinos de cáncer de mama .	103
4.1- APRIL promueve el crecimiento de tumores de mama inducidos por la inyección ortotópica de células 4T1 .....	103
4.1.1- Modelos de ortotransplantes de células 4T1 en ratones APRIL-Tg .....	104
4.1.1.1- La metástasis pulmonar se favorece en presencia de APRIL.....	106
4.1.1.2- La presencia de APRIL varía la composición del infiltrado tumoral .....	108
4.2- APRIL favorece el crecimiento de tumores espontáneos de mama. Modelo BALB/c/MMTV/neu.....	113
4.2.1- Influencia de la sobre-expresión de APRIL en el desarrollo espontáneo de tumores de mama en ratones. Modelo MMTV-neu/APRIL-Tg	113
4.2.2- La ausencia de APRIL retrasa el desarrollo espontáneo de tumores de mama en ratones. Modelo MMTV-neu/APRIL-KO .....	115
5- Análisis de la expresión de APRIL y sus receptores, BCMA y TACI en tumores primarios de mama .....	117
5.1- Tumores primarios de mama humanos de diferentes grados (I, II y III) expresan APRIL .....	117
5.2- Tumores primarios de mama de diferentes estadios (I, II y III) expresan BCMA y TACI.....	119
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>139</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>157</b>



# **ÍNDICE** **DE TABLAS Y FIGURAS**



## INTRODUCCIÓN

<b>Tabla I.1-</b> Nomenclatura de APRIL, BAFF y sus receptores TACI, BCMA, BAFF-R y HSPGs .....	36
<b>Figura I.1-</b> Organización genómica de APRIL .....	37
<b>Figura I.2-</b> Expresión de APRIL y sus receptores, interacción entre ellos y señalización desencadenada tras la interacción ligando-receptor .....	42
<b>Tabla I.2-</b> Características de los ratones que sobre-expresan APRIL, BCMA y TACI, o ratones deficientes para las mismas .....	46
<b>Figura I.3-</b> Marcadores del cáncer .....	48
<b>Figura I.4-</b> Modelo de acción de APRIL en células B tumorales .....	50
<b>Tabla I.3-</b> Resumen de la expresión de APRIL, BAFF, BCMA y TACI en diferentes tumores de origen hematopoyético, así como las principales funciones y mecanismos moleculares que APRIL desempeña en los mismos.....	51
<b>Figura I.5-</b> Estructura de la glándula mamaria y alteraciones del microentorno en la transición de la mama normal hacia CDIS, CDI o tumores metastásicos .....	54
<b>Tabla I.4-</b> Clasificación molecular de los tumores de mama .....	56
<b>Figura I.5-</b> Principales características del desarrollo tumoral en los ratones MMTV-HER2, que sobre-expresan el onocgen neu, en fondo genético BALB/c. ....	58

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla M.1-</b> Líneas celulares y medios de cultivo utilizados.....	67
<b>Tabla M.2</b> –Anticuerpos utilizados para <i>western blot</i> . ....	70
<b>Tabla M.3-</b> Anticuerpos utilizados para citometría de flujo y combinaciones de los mismos. ....	72
<b>Tabla M.4-</b> Oligonucleótidos y temperaturas de anillamiento RT-PCR y qRT-PCR...	74
<b>Tabla M.5-</b> Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica .....	76
<b>Tabla M.6-</b> Oligonucleótidos para genotipaje de ratones y condiciones de amplificación .....	77
<b>Figura M.1-</b> Generación de ratones MMTV-neu y MMTV-neu/APRIL-Tg .....	78

<b>Figura M.2-</b> Generación de ratones APRIL-KO y MMTV-neu/APRIL-KO en fondo BALB/c .....	80
---	----

## RESULTADOS

<b>Tabla R.1-</b> Líneas celulares .....	91
--	----

<b>Figura R.1-</b> Caracterización de los niveles de expresión de ARNm de APRIL en líneas celulares humanas de cáncer de mama .....	92
---	----

<b>Figura R.2-</b> Expresión de la proteína APRIL en líneas de carcinoma de mama .....	93
--	----

<b>Figura R.3-</b> Localización de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama humanas.	93
---	----

<b>Figura R.4-</b> Medida de la secreción de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama	94
--	----

<b>Figura R.5-</b> Modulación de la expresión de APRIL por ligandos TLR en líneas humanas de carcinoma de mama.....	95
---	----

<b>Figura R.6-</b> Expresión de los receptores BCMA y TACI.....	97
---	----

<b>Figura R.7-</b> APRIL favorece la proliferación celular .....	98
--	----

<b>Figura R.8-</b> La proteína APRIL endógena favorece la proliferación celular.....	99
--	----

<b>Figura R.9-</b> APRIL media la proliferación a través de BCMA y TACI.....	100
--	-----

<b>Figura R.10-</b> APRIL activa las rutas de señalización de AKT y las MAPKs p38 y ERK 1/2.....	102
--	-----

<b>Figura R.11-</b> APRIL favorece la proliferación a través de las rutas de PI3K y de las MAPKs p38 y ERK1/2 .....	103
---	-----

<b>Figura R.12-</b> Expresión de APRIL y sus receptores en células 4T1 .....	104
--	-----

<b>Figura R.13-</b> Niveles de APRIL circulante en ratones APRIL-Tg .....	105
---	-----

<b>Figura R.14-</b> Crecimiento de los tumores 4T1.....	105
---	-----

<b>Figura R.15-</b> Análisis de la expresión de APRIL humano y Ki67 en tumores 4T1 ....	106
---	-----

<b>Figura R.16-</b> Análisis macroscópico de los pulmones de ratones inoculados con células 4T1. ....	107
---	-----

<b>Figura R.17-</b> Caracterización del infiltrado leucocitario en tumores 4T1 .....	110
--	-----

<b>Figura R.18-</b> Caracterización celular de nódulos linfáticos drenantes de tumores 4T1 .....	112
--	-----

<b>Figura R.19-</b> Análisis de la aparición y crecimiento tumoral y de la supervivencia en el modelo MMTV-neu/APRIL-Tg.....	114
<b>Figura R.20-</b> Expresión de APRIL, BCMA y TACI en las mamas tumorales de los ratones MMTV-neu/APRIL-Tg y MMTV-neu. ....	115
<b>Figura R.21-</b> Análisis de la aparición y crecimiento tumoral y de la supervivencia en el modelo MMTV-neu/APRIL-Tg.....	117
<b>Figura R.22-</b> Expresión de APRIL en tumores humanos de mama.....	119
<b>Figura R.23-</b> Expresión de BCMA y TACI en tumores humanos de mama .....	120





## **ABREVIATURAS**



## A

ACE: Antígeno carcinoembrionario  
 ADN: Ácido desoxirribonucleico  
 ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
 ADNdc: Ácido desoxirribonucleico de doble cadena  
 AEC: 3-Amino-9-etilcarbazol  
 AID: *Activation-induced cytidine deaminase*  
 AP-1: *Activator protein-1*. Proteína activadora 1  
 APC: Allophycocyanin. Aloficocianina  
 APRIL: A proliferation inducing ligand  
 APRIL c: Forma completa de APRIL  
 APRIL s: Forma soluble de APRIL  
 AR: Artritis reumetoide  
 ARN: Ácido ribonucleico  
 ARNi/siRNA: Ácido ribonucleico de interferencia  
 ARNm/mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

## B

BAFF: *B cell activating factor belonging to the TNF family*  
 BAFF-R: *BAFF-receptor*  
 Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*  
 Bcl-x<sub>L</sub>: *B-cell lymphoma-extra large*  
 BCMA: *B cell maturation antigen*  
 BRCA-1: *Breast cancer 1* gene. Gen BRCA-1  
 BSA: *Bovine serum albumin*. Albúmina sérica bovina

## C

CA 19.9: *Carbohydrate antigen 19.9*. Antígeno carbohidrato 19.9  
 CAML: *Calcium-modulating cyclophilin ligand*  
 CD3: *Cluster of differentiation 3*. Conjunto de diferenciación 3  
 CD4: *Cluster of differentiation 4*. Conjunto de diferenciación 4  
 CD5: *Cluster of differentiation 5*. Conjunto de diferenciación 5

CD8: *Cluster of differentiation 8*. Conjunto de diferenciación 8  
 CD11b: *Cluster of differentiation 11b*. Conjunto de diferenciación 11b  
 CD11c: *Cluster of differentiation 11c*. Conjunto de diferenciación 11c  
 CD19: *Cluster of differentiation 19*. Conjunto de diferenciación 19  
 CD40: *Cluster of differentiation 40*. Conjunto de diferenciación 40  
 CD45: *Cluster of differentiation 45*. Conjunto de diferenciación 45  
 CD80/B7.1: *Cluster of differentiation 80*. Conjunto de diferenciación 80  
 CD86/B7.2: *Cluster of differentiation 86*. Conjunto de diferenciación 86  
 CDI: Carcinoma **d**uctal **i**nvasivo  
 CDIS: Carcinoma **d**uctal *i*n **s**itu  
 CEI: Células epiteliales del intestino  
 CMH-II: Complejo **m**ayor de **h**istocompatibilidad de tipo **I**I  
 CSR: *Class switch recombination*. Cambio de isotipo

## D

DAPI: 4',6-**d**iamidino-2-**f**enil-**i**ndol  
 DMEM: *Dulbecco modified eagle medium*  
 DMSO: **D**imetilsulfó**x**ido  
 DRC: **D**ominio **r**ico en **c**isteínas

## E

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Ácido etilen-diamino-tetra-acético  
 EGF: *Epidermal growth factor*. Factor de crecimiento epidérmico  
 ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*  
 ERK: *Extracellular-signal-regulated kinases*

## F

F12: *Hams F12 medium*  
 FACS: *Fluorescent-activated cell sorting*  
 FBS: *Fetal bovine serum*. Suero fetal bovino  
 Fc: *Fragment crystallizable region*. Región cristalizable de un anticuerpo  
 FCH: **F**actor de **c**recimiento de **h**epatocitos

FGF-2: *Fibroblast growth factor-2*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*. Isotiocianato de fluoresceína

FOXP3: *Forkhead box protein 3*

## G

GFR: *Growth factor receptor*

## H

hASC: *Human adipose-derived stem cells*. Células madre humanas derivadas del tejido adiposo

HEK-293T: *Human Embryonic Kidney 293-T cells*

HRS: células mononucleares de Hodgkin y Redd-Sternberg

HUGO: *Human Genome Organization*. Organización genoma humano

## I

IDVC: **I**munodeficiencia **v**ariable **c**omún

IFN $\alpha$ : **I**nterferón  **$\alpha$**

IFN $\gamma$ : **I**nterferón  **$\gamma$**

Ig: **I**mmunoglobulina

IgA: **I**mmunoglobulina **A**

IgG: **I**mmunoglobulina **G**

IgM: **I**mmunoglobulina **M**

IHQ: **I**mmunohistoquímica

## J

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

## K

KDa: **K**ilo **D**alton

KO: *Knockout*. Aplicado a ratones modificados genéticamente, a los que se les ha delecionado alguna proteína de su genoma

## L

LB: Linfoma de Burkitt

LCF: Linfoma de células foliculares

Lck: *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

LCM: Linfoma de las células del manto

LDCBG: Linfoma difuso de células B grandes

LES: Lupus eritematoso sistémico

LH: Linfoma de Hodgkin's

LLC: Leucemia linfoide crónica

LNH: Linfoma no-Hodgkin's

LPS: Lipopolisacárido

LTC: Linfocito T citotóxico

## M

MAPK: Mitogen activated protein kinases. Proteína quinasa activada por mitógenos

Mcl-1: *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*

MEC: Matriz extracelular

MEM: Minimum essential medium eagle

MM: Mieloma múltiple

MMP: *Matrix metalloproteinases*. Metaloproteinasas de matriz

MMTV: *Mouse mammary tumour virus*. Virus del tumor de mama

MTS: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NEAA: *Non-essentials aminoacids*. Aminoácidos no esenciales

## N

NFκB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK: *Natural killer cells*. Células asesinas naturales

## O

OCT: *Optimal Cutting Temperature embedding medium*. Medio de congelación para obtener una temperatura óptima de corte (usado en histología)

## P

PBS: *Phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino

PCR: *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PE: *Phycoerythrin*. Ficoeritrina

PECy7: *Conjugate system that combines PE and a cyanine dye 7*. Fluorocromo conjugado de ficoeritrina y cianina 7

PFA: **Paraformaldehído**

PGHS: **Proteoglicanos heparán sulfato**

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*. Fosfoinositol 3 quinasa

pIC: Ácido **poliinosínico-policitidílico**

PMAP: **Patrones moleculares asociados a patógenos**

Poli-(A:U): Ácido **poliadenílico-poliuridílico**

## R

RE $\alpha$ : **Receptor de estrógenos  $\alpha$**

RP: **Receptor de progesterona**

RPMI: *Roswell park memorial institute medium*

RRP: **Receptores de reconocimiento de patrones**

RT-PCR: *Retro-transcription polymerase chain reaction*. Combinación de las reacciones de retro-transcripción y reacción en cadena de la polimerasa

RT: *Room temperature*. Temperatura ambiente

## T

TACI: *Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*

TD: Respuesta **T** dependiente

Tg: **T**ransgénico. Aplicado a ratones modificados genéticamente, a los que se les ha introducido alguna proteína en su genoma

TGFβ: **T**ransforming **g**rowth **f**actor **β**

Th1: **T-helper-1** *CD4+ lymphocyte*. Linfocito T cooperador de tipo 1

Th2: **T-helper-2** *CD4+ lymphocyte*. Linfocito T cooperador de tipo 2

THD: **TNF** **h**omology **d**omain. Dominio de homología del TNF

TI: Respuesta **T** independiente

TI-1/TI-2: Respuesta **T** independiente de tipo **I/II**

TLAM: **T**ejido linfoide **a**sociado a la **m**ucosa

TLR: **Toll like receptor**. Receptores tipo Toll

TLR3: **Toll like receptor 3**. Receptor tipo Toll 3

TNF: **Tumor** **n**ecrosis **f**actor. Factor de necrosis tumoral

TNFR: **Tumor** **n**ecrosis **f**actor-**r**eceptor. Receptor del factor de necrosis tumoral

TNM: Clasificación **t**umor/**n**ódulo/**m**etástasis

TRAF: **TNF** **r**eceptor-**a**sociated **f**actors. Factores asociados a los TNFR

Treg: **T**regulatory **c**ells. Células T reguladoras

## U

UTR: **U**ntranslated **r**egion. Región no traducida de los genes

## V

VPH: Virus del **p**apiloma **h**umano

VEB: Virus de **E**pstein-**B**arr

## W

WAP: **W**hey **a**cidic **p**rotein

WT: **W**ild **t**ype. Aplicado a ratones silvestres no modificados genéticamente

## X

XEDAR: **X**-linked **e**ctodysplasin **r**eceptor







## **SUMMARY**



APRIL is a protein belonging to the tumour necrosis factor (TNF) ligand family that is expressed by immune cells and cells outside the immune system like osteoclasts, epithelial and mesenchymal stem cells. Moreover, high levels of APRIL mRNA and protein have been found in hematopoietic malignancies such as leukaemia and lymphoma and correlate with disease progression. In breast carcinoma and other solid tumours, immunohistochemistry analysis has shown that APRIL is expressed, although the role of this cytokine in tumour development, maintenance or progression is still unclear. In this study we aim to investigate the implication of APRIL in breast cancer using various experimental models.

We described that four human breast carcinoma cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47-D and MCF-7) express APRIL and its receptors, BCMA and TACI, at different levels, and that inflammatory stimuli enhance APRIL secretion. We studied the APRIL effect on cell growth and found that addition of recombinant APRIL increases cell proliferation in the four cell lines. siRNA experiments confirmed this result and indicated that endogenous APRIL sustains basal cell proliferation through both receptors. We also investigated the signalling pathways implicated and found that APRIL activates p38 and ERK1/2 MAP-Kinases.

To examine the influence of APRIL in breast cancer *in vivo*, we used two approaches. We generated MMTV-neu/APRIL double transgenic (Tg) mice and saw no differences in tumour onset but an increment in tumour growth (volume) and a reduced tumour free survival in double-Tg compared to MMTV-neu-Tg mice. We also carried on a syngeneic tumour transplant model injecting 4T1 tumour cells in APRIL-Tg and wild-type (WT) control mice. We found that tumour growth is enhanced in mice over-expressing APRIL compared to WT animals. In addition, analysis of 4T1 tumours revealed the presence of APRIL inside the tumours and a higher proliferation rate (Ki67 positive area) in mice carrying APRIL transgene.

We finally analysed human primary breast carcinoma tissue samples and saw that APRIL is expressed and correlates positively with tumour grade. TACI and BCMA are also present but we have not found a clear expression pattern yet.

Taken together, our results provide evidence of APRIL, BCMA and TACI expression in breast cancer. We also described a proliferation-promoting role of APRIL both *in vitro* and *in vivo*, and showed that this effect is mainly mediated by ERK- and p38-pathways.



# **INTRODUCCIÓN**





## **1- La familia del factor de necrosis tumoral (TNF)**

La familia del factor de necrosis tumoral (TNF) está compuesta por 19 ligandos y 29 receptores (TNFR) (Aggarwal y col. 2012), existiendo múltiples interacciones entre los miembros de ambas familias. La mayoría de los miembros de las familias TNF y TNFR se expresan en células del sistema inmune (Aggarwal 2003), donde juegan un papel fundamental en la inflamación, apoptosis, proliferación, invasión, angiogénesis y/o supervivencia (Aggarwal y col. 2012). Además, desde su descubrimiento inicial, los ligandos y receptores de la familia del TNF han sido asociados con el inicio de varias enfermedades (Lobito y col. 2011).

## **2- APRIL y BAFF**

A finales de los años 90 se descubrieron dos nuevos ligandos del TNF, APRIL (*a proliferation inducing ligand*) (Hahne y col. 1998) y BAFF (*B-cell activating factor of the TNF family*) (Schneider et al 1999), existiendo entre ambos un 30% de homología de secuencia (Wallweber y col. 2004). A su descripción inicial le siguieron una serie de publicaciones en las que se referían a estos dos nuevos ligandos con diferentes nomenclaturas, basadas en las diferentes funciones de los mismos (tabla I.1).

Estudios con proteínas recombinantes demostraron que APRIL y BAFF interaccionan con los receptores BCMA (*B-cell maturation antigen*) y TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*) (Marsters y col. 2000). Posteriormente se descubrió la existencia de otro receptor llamado BAFF-R (*BAFF-receptor*) (Thompson y col. 2001), que une de manera exclusiva a BAFF. Además, se ha descrito que APRIL puede unirse a los proteoglicanos heparán-sulfato (PGHSs) (Ingold y col. 2005) (Hendriks y col. 2005) (tabla I.1).

Acrónimo	Nombre completo (del inglés)	HUGO	CD	Referencia
APRIL	A proliferation-inducing ligand	TNFSF13	CD256	(Hahne y col. 1998)
TALL-2	TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 2			(Shu y col. 1999)
BAFF	B-cell activating factor of the TNF family	TNFSF13B	CD257	(Schneider y col. 1999)
BLyS	B lymphocyte stimulator			(Moore y col. 1999)
TALL-1	TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1			(Shu y col. 1999)
THANK	TNF homologue activates apoptosis, NFκB and JNK			(Mukhopadhyay y col. 1999)
zTNF4	z-Tumour-necrosis factor-4			(Gross y col. 2000)
TACI	Transmembrane activator and CAML interactor	TNFRSF13B	CD267	(von Bulow y Bram 1997)
BCMA	B-cell maturation antigen	TNFRSF17	CD269	(Gras y col. 1995)
BAFF-R	BAFF-receptor	TNFRSF13C	CD268	(Thompson y col. 2001)
BR3	BLyS receptor-3			(Yan y col. 2001a)
Bcmd	B-cell maturation defect			(Lentz y col. 1998)
PGHS	Heparan sulphate proteoglycans			(Hendriks y col. 2005) (Ingold y col. 2005)

**Tabla I.1-** Nomenclatura de APRIL, BAFF y sus receptores TACI, BCMA, BAFF-R y PGHS

### 3- Estructura y procesamiento de APRIL

#### 3.1- Estructura del gen que codifica para APRIL

El gen que codifica para APRIL se localiza en el cromosoma 17p13.1 en humanos y en el cromosoma 11B4 en ratón (Cancro 2004). El gen humano de APRIL contiene seis exones que, mediante procesamientos alternativos, pueden ser transcritos como cuatro ARN mensajeros (ARNm) diferentes. Un raro evento de procesamiento alternativo, combina los exones 1 y 3, generando una forma unida a membrana, no procesada y sin sitio de unión a los glicosaminoglicanos (APRIL-δ). La falta del exón 3 da lugar a la forma APRIL-β. La isoforma de APRIL-γ ha sido poco estudiada, y se genera debido al acortamiento de cuatro aminoácidos en el exón 6, que son reemplazados por un único aminoácido (Bossen y Schneider 2006). Por último, en el año 2011, se describió la isoforma APRIL-ε, a la que le faltan los exones 2 y 3 (Maia y col. 2011) (figura I.1). En ratón no se han descrito secuencias similares a estas isoformas, aunque si se conoce la existencia de dos variantes con frecuencias similares, que difieren entre si en un único aminoácido (Alanina120) (Bossen y Schneider 2006).

Esta sutil diferencia en la secuencia se debe al uso alternativo de dos posibles sitios de procesamiento al comienzo del exón 4 (figura I.1).

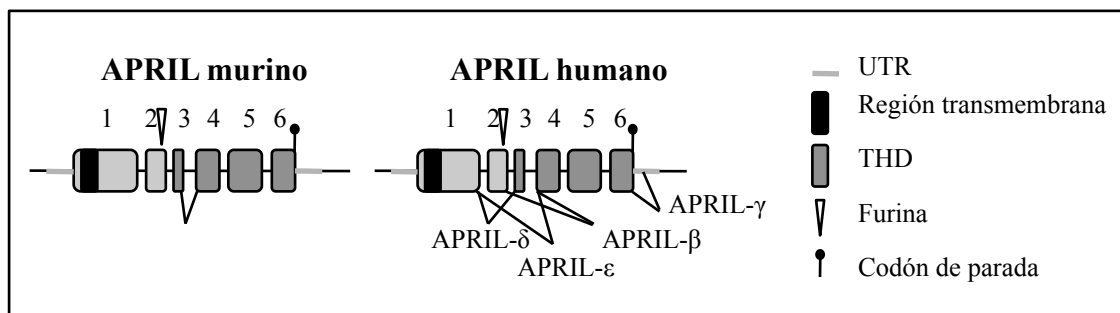


Figura I.1- Organización genómica de APRIL (adaptada de Bossen y col. 2006).

### 3.2- Estructura y procesamiento de la proteína APRIL

La ausencia de un péptido señal sugiere que APRIL es una proteína transmembrana de tipo II, típica de la familia de ligandos del TNF (Hahne y col. 1998). La proteína humana consta de 250 aminoácidos, con un dominio citoplasmático amino terminal de 28 aminoácidos, una región transmembrana hidrofóbica de 21 aminoácidos y un dominio extracelular carboxilo terminal de 201 aminoácidos, conocido también con el nombre de dominio de homología del TNF (THD, *TNF homology domain*), responsable de la unión al receptor (Aggarwal 2003). Además, en su estructura APRIL contiene un sitio de glicosilación en el aminoácido asparagina 124. La resolución de la estructura cristalina de la proteína APRIL murina mostró su similitud con su homóloga humana (Wallweber y col. 2004).

La mayoría de los ligandos del TNF se sintetizan como proteínas transmembrana de tipo II, cuyo procesamiento suele darse en la membrana plasmática en la región de la cola, entre los dominios transmembrana y de unión al receptor. Este procesamiento tiene como resultado la liberación al medio de los ligandos en forma de homotrímeros. A diferencia del resto de los ligandos de la familia, APRIL es procesada intracelularmente (Lopez-Fraga y col. 2001), lo que da lugar a la secreción en forma de homotrímero de su forma biológicamente activa (Cancro 2004). El procesamiento de APRIL tiene lugar en el aparato de Golgi, en una región rica en argininas, por una furina expresada de manera ubicua como una convertasa (Lopez-Fraga y col. 2001). Recientemente se ha descrito la existencia de una forma de APRIL unida a la membrana de los macrófagos, la cual puede modular la actividad inflamatoria y fagocítica de estas

células (Lee y col. 2010). En células B de pacientes con leucemia también se ha descrito la existencia de una forma de APRIL unida a membrana, posiblemente la isoforma APRIL- $\delta$  (Maia y col. 2011).

#### **4- Expresión de APRIL**

APRIL se expresa en diferentes poblaciones de células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Hahne y col. 1998, Mukhopadhyay y col. 1999, Nardelli 2001, Litinskiy y col. 2002). Un artículo publicado en 2007, describe la expresión de los ARNm de APRIL y BAFF en diferentes sub-poblaciones de células B de ratón, así como en células B activadas *in vitro* e *in vivo* (Chu y col. 2007). Además, APRIL se expresa en células que no pertenecen al sistema inmune, como células epiteliales (He y col. 2007), osteoclastos (Moreaux y col. 2005) y células madre (Zonca y col. 2011). La expresión de APRIL se induce en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos, citoquinas del microambiente celular como IFN $\alpha$  ó IFN $\gamma$ , los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), los ligandos de los TLRs o la activación de CD40 (Craxton y col. 2003, Litinskiy y col. 2002, Nardelli 2001). Además de hacerlo en condiciones fisiológicas, se ha encontrado expresión de APRIL en diferentes patologías, como enfermedades autoinmunes y cáncer, tal y como se detallará en apartados posteriores.

Hace ahora una década se describió la presencia de homotrómeros de APRIL y BAFF, así como de heterotrómeros (sin estequiometría definida) formados entre ambas moléculas, en el suero de pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes que incluyen el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR), el síndrome de Reiter, la artritis psoriásica o la espondilitis anquilosante (Roschke y col 2002, Dillon y col. 2010). Estos datos sugieren que los homo y los heterotrómeros pueden desempeñar algún papel en el inicio y desarrollo de enfermedades autoinmunes.

## **5- Receptores de APRIL**

### **5.1- Receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNFR)**

Los 19 ligandos del TNF median su respuesta celular a través de su unión a uno o varios receptores del TNFR. Estos receptores son en su mayoría proteínas transmembrana de tipo I (con un dominio extracelular amino terminal y un extremo intracelular carboxilo terminal), aunque hay algunas excepciones como las de los receptores BCMA, TACI, BR3 y XEDAR (*X-linked ectodermal dysplasia receptor*), que son proteínas transmembrana de tipo III a las que le falta un péptido señal.

#### **5.1.1- TACI**

TACI se describió por primera vez en 1997, usando un ensayo de dos híbridos para proteínas que interaccionaran con CAML (*calcium-modulating cyclophilin ligand*) (von Bulow y Bram 1997). Se localiza en el cromosoma 17p11.2 de humanos, y en el cromosoma 11 de ratón (Cancro 2004). La proteína TACI murina tiene 249 aminoácidos, pero le faltan 30 aminoácidos en el extremo amino terminal que si están presentes en la proteína humana, siendo la homología total de un 54% entre ambas especies. En su región extracelular TACI presenta dos dominios ricos en cisteínas (DRC), aunque solo el segundo de ellos es necesario para que se una con una alta afinidad a APRIL y/o BAFF. De hecho, se conoce una forma más corta del receptor, a la que le falta el primer DRC, y que sigue siendo funcional (Hymowitz y col. 2005).

TACI se expresa en la superficie de células B de distinto estadio de maduración. En ratón, este receptor se manifiesta débilmente en células B transicionales inmaduras de tipo 1, y de manera fuerte en las células B transicionales de tipo 2, células de la zona marginal, células B-1 y células activadas foliculares (Katsenelson y col. 2007, Ng y col. 2004, Ng y col. 2006, Trembl y col. 2007). En humano, TACI se expresa principalmente en las células B memoria CD27 positivas (Novak y col. 2004). La expresión de TACI en linfocitos T, tanto de ratón como de humano, es un tanto controvertida y parece depender de la localización y estado de activación de los mismos (von Bulow y Bram 1997, Seyler y col. 2005, Ng y col. 2004).

TACI es un receptor que puede unir a APRIL y BAFF con afinidades comparables (Marsters y col. 2000, Yu y col. 2000). De manera complementaria, se ha descrito que la señalización a través de TACI requiere su unión a oligómeros compuestos por más de tres monómeros de APRIL y/o BAFF (Bossen y col. 2008). Una vez unido a su ligando, este receptor recluta a la proteína adaptadora MyD88 (He y col. 2010) e interacciona con las proteínas TRAF (*TNF receptor-associated factors*) 2, 5 y 6 para desencadenar cascadas de señalización que activan los factores de transcripción NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y AP-1 (*activator protein-1*) (Marsters y col. 2000, Xia y col. 2000), las cuales organizan la expresión de genes implicados en el desarrollo de células B.

### **5.1.2- BCMA**

BCMA se descubrió en 1992, debido a su implicación en la translocación t(4;16)(q26;p13.1) del gen de la interleuquina 2 (IL-2) en un linfoma de células T en humanos (Laabi y col. 1992). La proteína murina consta de 185 aminoácidos localizados en el cromosoma 16B3 (Madry y col. 1998), mientras que en humanos consta de 184 aminoácidos y se sitúa en el cromosoma 16p13.1, siendo la homología entre ambas de un 62%. En su estructura, BCMA contiene un solo DRC (Hymowitz y col. 2005) que toma contacto con un único monómero dentro de los trímeros o estructuras de orden superior de APRIL y BAFF.

La descripción de la localización celular de BCMA es principalmente superficial (Ng y col. 2004). En ratón, BCMA se expresa en las células plasmáticas y aumenta con la activación de las células B. En humano, se expresa en células plasmáticas, plasmablastos y centros germinales de las amígdalas (O'Connor y col. 2004, Trembl y col. 2007).

Según varios grupos APRIL y BAFF se unen con afinidades similares a BCMA (Marsters y col. 2000, Yu y col. 2000). Sin embargo, otros autores describen afinidades divergentes de este receptor por sus ligandos (Wu y col. 2000, Day y col. 2005, Patel y col. 2004). Estas diferencias pueden deberse a distintas aproximaciones metodológicas o a las fuentes de origen de las proteínas utilizadas en los ensayos. Una vez unido a su ligando, BCMA interacciona con las proteínas TRAFs 1, 2 y 3, desencadenando

cascadas de señalización que activan a la vía clásica de NFκB y a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) p38 y JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Hatzoglou y col. 2000, Shu y col. 1999).

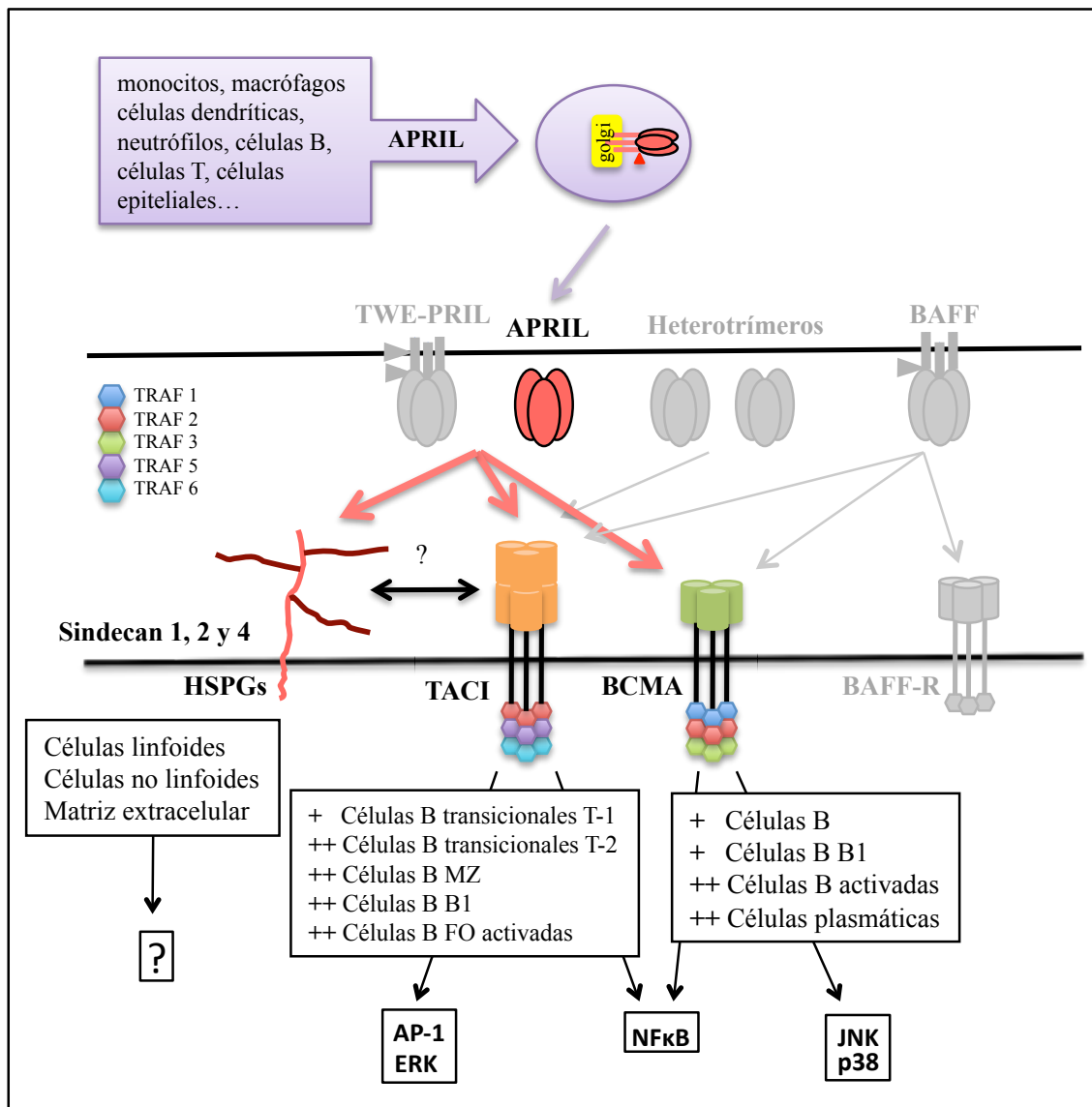
### **5.2- Proteoglicanos heparán sulfato (PGHS)**

En el año 2005, dos grupos describieron la unión de APRIL a los PGHSs (Hendriks y col. 2005, Ingold y col. 2005) que se expresan de manera ubicua en la superficie celular, así como en la membrana basal y matriz extracelular. La unión entre APRIL y los proteoglicanos implica la interacción de la cadena sulfatada de los glicosaminoglicanos con dos sitios de unión en la citoquina: el primero es una secuencia básica de aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína secretada, y el segundo es una secuencia básica en la superficie de la molécula, cercana al lugar de unión de los receptores. Este sitio de unión a los PGHSs es diferente al de BCMA y TACI, por lo que APRIL se puede unir a ambos de manera simultánea (Hendriks y col. 2005, Ingold y col. 2005).

La importancia biológica de la unión de APRIL a los proteoglicanos no está clara, y existen diferentes teorías al respecto. En primer lugar, se ha postulado que algunos PGHSs concentran al ligando en la superficie celular aumentando la activación de su receptor, como ocurre con el factor de crecimiento de hepatocitos (FCH) (van der Voort y col. 1999). También se ha descrito que los proteoglicanos pueden actuar como cofactores, y es el caso del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2, *fibroblast growth factor-2*) (Delehedde y col. 2000). En 2006 se describió que los PGHSs sindecan-1, 2 y 4 son capaces de unirse a TACI y activarlo (Bischof y col. 2006). Un año más tarde se publicó que los PGHSs junto con TACI regulan la producción de la inmunoglobulina A (IgA) inducida por APRIL en las células B (Sakurai y col. 2007). En 2008 se describió que en el tejido linfoide asociado a la mucosa, APRIL se produce después de una infección y es retenido en el epitelio unido a los proteoglicanos, aumentando la supervivencia de las células plasmáticas (Huard y col. 2008). Posteriormente, en un trabajo de 2009 se detalló que APRIL se une a sindecan-1, actuando este de co-receptor para la unión entre APRIL y TACI en células de mieloma múltiple (Moreaux y col. 2009a).

Además de las funciones descritas anteriormente, la unión de APRIL a los PGHSs podría ser relevante en la inflamación y el cáncer (Casu y col. 2010), ya que los proteoglicanos son uno de los principales componentes de la matriz extracelular (MEC) y median las interacciones entre las células y la matriz.

En la figura I.2 se detallan algunos de los aspectos más importantes descritos en los apartados anteriores, tales como la expresión de APRIL, BCMA y TACI, así como las cascadas de señalización que se desencadenan tras la unión del ligando a sus receptores.



**Figura I.2-** Expresión de APRIL y sus receptores, interacción entre ellos y señalización desencadenada tras la interacción ligando-receptor



## 6- Funciones de APRIL

Las células B son hasta la fecha, las principales células diana para APRIL, ya que es en ellas donde se expresan de manera mayoritaria sus receptores BCMA y TACI. Estudios *in vitro* han mostrado que APRIL estimula la proliferación de células B vírgenes humanas y murinas (Yu y col. 2000, Craxton y col. 2003). Además, APRIL mejora la capacidad presentadora de antígenos de las células B *in vitro* mediante el incremento de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80/B7.1, CD86/B7.2 o el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (CMH-II), a través principalmente de su unión a BCMA (Yang y col. 2005). Por otra parte, APRIL promueve la supervivencia de los plasmablastos en su camino a la diferenciación hacia células plasmáticas (Belnoue y col. 2008, Burjanadze y col. 2009) así como de las células plasmáticas presentes en el tejido linfoide asociado a la mucosa (TLAM) (Huard y col. 2008). Este efecto es mediado principalmente por BCMA (Avery 2003, O'Connor y col. 2004). APRIL también favorece el cambio de isotipo (CSR, *class switch recombination*) hacia inmunoglobulina G (IgG) e IgA de manera independiente de las células T (TI) (Litinskiy y col. 2002, He y col. 2003), efecto mediado únicamente a través de TACI (Castigli y col. 2005). Además, se ha visto como APRIL es un factor importante en la inmunidad humoral de la mucosa intestinal. Las células epiteliales del intestino (CEIs) en respuesta a ligandos de los TLRs (*toll-like receptors*) presentes en las bacterias intestinales, secretan APRIL al medio, que actúa sobre las células B de la mucosa intestinal, induciendo el cambio de isotipo hacia IgA (He y col. 2007). Las CEIs también pueden inducir CSR de manera indirecta a través de la secreción de la linfopoyetina del estroma tímico, cuya presencia es detectada por las células dendríticas de la lámina propia, dando lugar a la liberación de APRIL (He y col. 2007, Massacand y col. 2008).

A diferencia de lo que ocurre con las células B, el papel de APRIL sobre los linfocitos T ha sido menos definido hasta el momento. Varios trabajos iniciales demuestran que esta citoquina puede co-estimular *in vitro* a las células T (Yu y col. 2000, Wang y col. 2001, Huard y col. 2001, Ng y col. 2004). Como los linfocitos T expresan solamente el receptor TACI (Wang y col. 2001), este sería el responsable, aunque los PGHSs también podrían estar actuando (Hendriks y col. 2005). Además, APRIL parece estar implicada en la supervivencia de los linfocitos T, tal y como

demuestran experimentos realizados con células T de ratones transgénicos para APRIL (APRIL-Tg) (Stein 2002).

En células madre derivadas del tejido adiposo (hASC, *human adipose-derived stem cells*) se ha visto que APRIL aumenta su proliferación sin afectar a su capacidad inmunosupresora (Zonca y col. 2011). También se ha descrito que APRIL podría ser un factor de crecimiento autocrino durante la megacariocitopoyesis (Bonci y col. 2004) aunque su papel no sería esencial para la producción de plaquetas, como demuestran experimentos realizados con ratones deficientes para APRIL, en los que no se observa ningún tipo de trombocitopenia (Castigli y col. 2004, Varfolomeev y col. 2004)

### **6.1- Modelos animales para el estudio de APRIL y sus receptores**

Los ratones APRIL-Tg expresan el gen humano de APRIL bajo el control del promotor distal lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) específico de células T, que dirige la expresión del transgen hacia timocitos maduros y linfocitos T periféricos (Stein 2002). Mediante ensayos de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) los autores de este trabajo comprobaron que la proteína APRIL humana recombinante se une a los receptores TACI y BCMA murinos (Stein 2002). El análisis de los ratones APRIL-Tg (entre 8 y 12 semanas de edad) mostró que no había alteraciones en el número total de células esplénicas, en el peso y estructura del bazo, así como en la composición de linfocitos T y B en los órganos linfoides secundarios. Previamente se observó como APRIL estimulaba la producción de IgM en células B periféricas de la sangre (Marsters y col. 2000), por lo que no es extraño encontrar una mayor producción de IgM en los ratones APRIL-Tg, mientras que los niveles de IgG son normales en ausencia de estimulación antigénica. Además, los ratones APRIL-Tg tienen una respuesta humoral aumentada frente a antígenos T-dependientes (TD), así como frente a estímulos T-independientes de tipo II (TI-2) (Stein 2002).

En 2004 se describió que los ratones APRIL-Tg mayores de 5 meses de edad, desarrollan tumores en las placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos, debido a la acumulación de células B1 CD5<sup>+</sup> en el peritoneo (Planelles y col. 2004). Estos tumores se asemejan a la leucemia linfoide crónica (LLC) humana, caracterizada por

una acumulación progresiva de células B CD5<sup>+</sup> debida a un aumento en su supervivencia.

Los ratones deficientes (KO, *knockout*) para APRIL (APRIL-KO) fueron generados de manera simultánea por dos grupos. Un grupo describió como la ausencia de APRIL no tiene ningún efecto significativo en el desarrollo de los principales órganos y tejidos, en la función *in vitro* de las células T y B o en la respuesta humoral (Varfolomeev y col. 2004). Por el contrario, otro grupo demostró que los ratones APRIL-KO, a pesar de tener un desarrollo y una proliferación normales de las células B y T *in vitro*, tienen un aumento en el número de células T efectoras de memoria, unos niveles más bajos de IgA en el suero, y una respuesta TD y TI-1 disminuida (Castigli y col. 2004).

El uso de los ratones transgénicos y deficientes para BCMA y TACI, también ha sido de ayuda a la hora de estudiar algunas funciones de APRIL. Los ratones BCMA-Tg no tienen ningún fenotipo destacable (Schneider 2001), y entre la información que ofrecen los ratones BCMA-KO se ha descrito que estos animales tienen un desarrollo normal de las células B y T y una menor supervivencia de las células plasmáticas (O'Connor y col. 2004). Los principales efectos observados en los ratones TACI-Tg muestran que hay una disminución o ausencia de células B1, así como una bajada de células B2 foliculares debido a un bloqueo en el estadio T1 (Gross y col. 2001, Schneider 2001). En contraposición a este fenotipo se encuentra el de los ratones TACI-KO, en los que el número de células B maduras está aumentado y en los que se da una respuesta disminuida frente a antígenos TI-2 (von Bulow y col. 2001), sugiriendo esto último un papel de TACI como regulador negativo de la respuesta TI-2. Además, los ratones TACI-KO tienen una gran cantidad de autoanticuerpos circulantes y desarrollan linfadenopatías y nefritis asociadas a enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (Yan y col 2001b, Seshasayee y col. 2003).

En la tabla I.2 se resumen las características fenotípicas más importantes de los ratones que sobre-expresan APRIL, BCMA y/o TACI, así como de ratones deficientes para dichas proteínas

Ratón	Fenotipo	Referencia
APRIL-Tg (APRIL humano expresado en células T)	- Mayor supervivencia de células T <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , correlacionado con niveles aumentados de Bcl2 - Respuesta aumentada de IgM, pero no de IgG, a antígenos T-dependientes - Respuesta aumentada de IgM e IgG frente a antígenos TI-2	(Stein 2002)
	- Neoplasia de células B1 en ratones viejos	(Planelles y col. 2004)
APRIL-KO	- Menor cantidad de IgA circulante - Respuestas de IgA dañadas - Mayor número de células T efectoras/memoria - Reacciones aumentadas en los CG - Poblaciones normales de células B periféricas	(Castigli y col. 2004)
	- Sin fenotipo destacable - Desarrollo y función <i>in vitro</i> de células B y T normales - Respuestas TD y TI normales	(Varfolomeev y col. 2004)
BCMA-Ig Tg (BCMA murino que une bien APRIL, pero débilmente BAFF)	-Sin fenotipo destacable	(Schneider 2001)
BCMA-KO	- Desarrollo normal de células B y T	(Xu y Lam 2001, Schiemann y col. 2001)
	- Menor supervivencia de las células plasmáticas de larga vida	(O'Connor y col. 2004)
TACI-Ig Tg (dominio extracelular de TACI humano)	- Ausencia de células B1 - Bloqueo de las células B2 en el estadio T1	(Gross y col. 2001)
	- Depleción de las células B de la zona marginal y células B2 foliculares - Leve efecto en las células B1 del peritoneo	(Schneider 2001)
TACI-KO	- Células B maduras aumentadas - Respuesta disminuida frente a antígenos TI-2 - Células B hiper-respondedoras	(von Bulow y col. 2001)
	- Nefritis asociada a LES (autoanticuerpos circulantes) - Muerte prematura por nefritis y/o linfoma - Linfadenopatías	(Yan y col. 2001b, Seshasayee y col. 2003)
BCMA xTACI-KO	-Similar al del ratón TACI-KO	(Shulga-Morskaya y col. 2004)

**Tabla 1.2-** Características de los ratones que sobre-expresan APRIL, BCMA y TACI, o ratones deficientes para las mismas.

## 6.2- APRIL en enfermedades autoinmunes

Son varias las evidencias que sugieren la implicación de APRIL tanto en el inicio como en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. En lupus eritematoso sistémico (LES), se han encontrado niveles aumentados de APRIL y de heterotrimeros APRIL/BAFF en el suero de los pacientes, correlacionándose los primeros de manera inversa con los de anticuerpos anti-ADNdc y con manifestaciones musculo-esqueléticas (Koyama y col. 2005, Stohl y col. 2004, Dillon y col. 2010). El análisis molecular del gen que codifica para APRIL ha puesto de manifiesto que pacientes con LES expresan

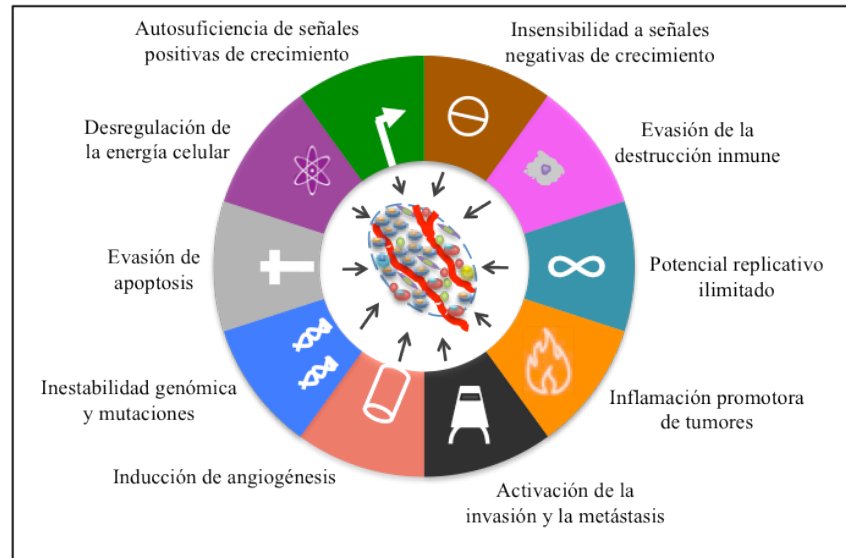
dos polimorfismos en los codones 67 y 96 que se asocian con el desarrollo de la enfermedad (Lee y col. 2007). Otro ejemplo es la artritis reumatoide (AR), caracterizada por la destrucción de las articulaciones debido a una inflamación crónica de las mismas, y en la que los pacientes presentan niveles aumentados de APRIL tanto en el fluido sinovial como en el suero (Cheema y col. 2001, Tan y col. 2003). En los pacientes de AR, los fibroblastos del tejido sinovial producen altos niveles de APRIL de manera constitutiva y dependiente de la activación del TLR3. Además, en estos pacientes, APRIL modula de manera directa la expresión de AID (*activation-induced cytidine deaminase*) y el cambio de isotipo hacia IgG e IgA en las células B (Bombardieri y col. 2011).

No solo en LES y AR, también se han encontrado altos niveles de APRIL en el suero de pacientes con otras enfermedades autoinmunes, como el síndrome de Sjögren (Jonsson y col. 2005, Szodoray y Jonsson 2005) o la esclerosis múltiple (Thangarajh y col. 2005). Es de esperar que futuras investigaciones ayuden a clarificar la relevancia de APRIL en las patologías autoinmunes.

### **6.3- APRIL en cáncer**

El término cáncer agrupa un conjunto de enfermedades que implican el crecimiento y propagación sin control de células neoplásicas originadas a partir de células normales que sufren alteraciones genéticas. Gracias a estas modificaciones, las células normales se transforman en tumorales y adquieren una serie de propiedades que les permiten escapar de los estrictos mecanismos de control a los que están sometidas para expandirse en número y colonizar tejidos distantes de aquel en el que se originaron. Las propiedades adquiridas por las células tumorales son: autosuficiencia de señales positivas de crecimiento, insensibilidad a señales negativas de crecimiento, evasión de la apoptosis, adquisición de capacidad replicativa ilimitada, angiogénesis sostenida y adquisición de capacidad metastásica (Hanahan y Weinberg 2000). Una década después de la importante aportación de Hanahan y Weilberg al conocimiento de los mecanismos que rigen el desarrollo del cáncer, se han postulado otras propiedades adicionales, como son la capacidad de desregular la energía celular y de evitar su destrucción por parte del sistema inmune (figura I.3) (Cavallo y col. 2011, Hanahan y Weinberg 2011). El sistema inmune juega un papel importante en el cáncer, y su aportación al desarrollo de

la enfermedad es compleja debido a los múltiples efectos que pueden tener las diferentes células que infiltran el tumor. De esta manera, y dependiendo del tipo de respuesta generada, el sistema inmune tiene la potencialidad de restringir o facilitar el crecimiento tumoral (DeNardo y Coussens 2007).



**Figura 1.3-** Marcadores del cáncer (Adaptada de Hanahan y col. 2011)

La asociación inicial entre APRIL y cáncer data de 1998, cuando se descubrió la citoquina y se observó que promovía la proliferación de células tumorales *in vitro* (Hahne y col. 1998). Desde entonces, se ha generado mucho conocimiento en el campo y a continuación resumimos la información disponible sobre la implicación de APRIL en distintos tipos de cáncer.

### 6.3.1- Tumores de origen hematopoyético

El análisis de los ratones APRIL-Tg aportó la primera evidencia directa del papel promotor de APRIL en cáncer, ya que estos animales desarrollan una neoplasia de células B tipo B-1 (Planelles y col. 2004). Desde entonces, en diferentes tumores humanos de origen hematopoyético, principalmente leucemias y linfomas, se ha detectado la sobre-expresión de APRIL tanto en las células tumorales, como en otras células del microambiente tumoral (Planelles y col. 2008).

Por ejemplo, en linfomas no-Hodgkin's (LNH), como son el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y linfomas de Burkitt (LB), las propias células B tumorales y los neutrófilos del microentorno tumoral expresan APRIL (Schwaller y col. 2007a).

Además, los altos niveles de expresión de la citoquina se relacionan de manera directa con una mayor agresividad de la enfermedad, así como una menor supervivencia de los enfermos (Schwaller y col. 2007a). Por otra parte, en el linfoma de Hodgkin's (LH), que se caracteriza por la expansión clonal de células mononucleares de Hodgkin y Reed-Sternberg (HRS) se ha descrito que son los neutrófilos del microambiente tumoral, y no las células HRS, los principales productores de APRIL (Schwaller y col. 2007b, Chiu y col. 2007).

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad progresiva e incurable que se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea. La expresión de APRIL se ha detectado en diversas líneas celulares de MM y también en el suero y en la médula ósea de estos pacientes, tanto en las propias células tumorales como en los osteoclastos, los cuales parecen ser la principal fuente de esta citoquina (Abe y col. 2006, Moreaux y col. 2004).

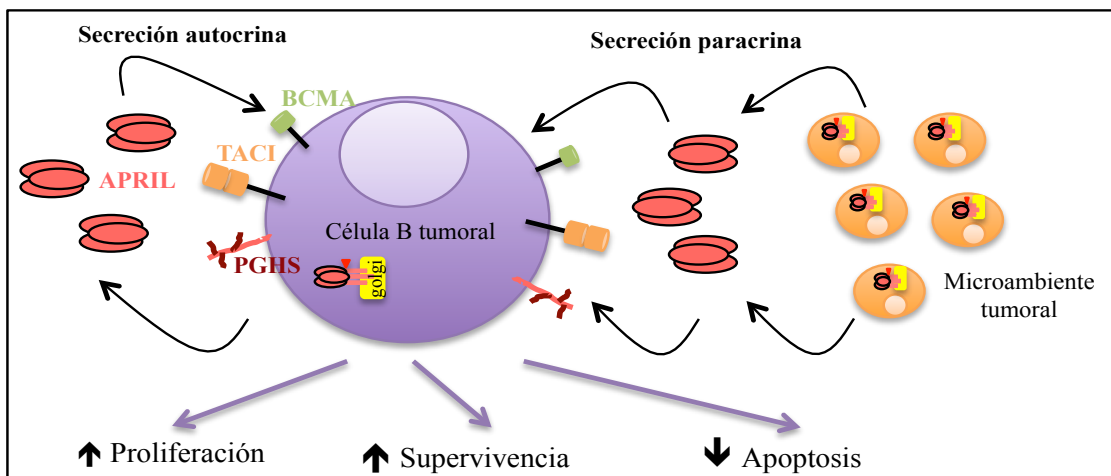
La leucemia linfocítica crónica (LLC) se caracteriza por la acumulación progresiva de células B maduras que expresan CD5, CD23 y bajos niveles de Igs. Mediante RT-PCR, varios grupos demostraron la expresión de APRIL en las células B tumorales (Kern y col. 2004, Novak y col. 2002, Planelles y col. 2004). Un estudio posterior mostró que no solo las células tumorales sino que también las células *nurse-like* secretan grandes cantidades de APRIL (Nishio y col. 2005). En LLC se han detectado niveles elevados de la citoquina en el suero de pacientes (Haiat y col. 2006, Planelles y col. 2004), y se han relacionado de manera directa y significativa con una menor supervivencia y un peor pronóstico (Planelles y col. 2007), lo que sugiere el potencial uso de APRIL en clínica.

Los receptores BCMA y TACI, a través de los cuales señala APRIL, se expresan de manera mayoritaria en las células B, por lo que no es sorprendente encontrarlos en la superficie de células tumorales de LLC (Novak y col. 2002, Planelles y col. 2004, Kern y col. 2004), LH (Schwaller y col. 2007b, Chiu y col. 2007) y varios LNH tales como linfoma de las células del manto (LCM) (He y col. 2004), linfoma de las células foliculares (LCF) (Gupta y col. 2009), LB (Schwaller y col. 2007a) y LDCBG (Lofstrom y col. 2011). Los niveles de expresión de BCMA y TACI varían en pacientes con la misma enfermedad, y es probable que sea la transformación maligna de las

células B la que promueva la expresión aberrante de ambos receptores.

Las células tumorales de LH, LNH y LLC expresan BCMA y TACI, y se ha descrito que APRIL estimula su supervivencia *in vitro* como resultado de la activación de la vía clásica de NFκB (Chiu y col. 2007, He y col. 2004, Endo y col. 2007). Las células de MM expresan BCMA de manera uniforme y TACI de una manera más variable, incrementando su supervivencia en respuesta a APRIL (Abe y col. 2006, Moreaux y col. 2004). Además de este efecto, APRIL aumenta la proliferación y disminuye la apoptosis en LH (Chiu y col. 2007), LNH (He y col. 2004) y MM (Novak y col. 2004), mientras en LLC APRIL no afecta a la proliferación celular pero si reduce la apoptosis (Haiat y col. 2006). El papel de APRIL favoreciendo la supervivencia de células B tumorales *in vitro*, se confirmó *in vivo* al observar que los ratones APRIL-Tg desarrollan neoplasias que se originan en las células B de tipo B-1 y que recuerdan a la LLC humana (Planelles y col. 2004).

Todos estos estudios han mostrado que APRIL puede actuar de manera autocrina y/o paracrina sobre la célula tumoral (Dillon y col. 2006). Después de unirse a sus receptores, APRIL promueve la supervivencia y proliferación celular e inhibe la apoptosis de la célula tumoral (figura I.4). En leucemias y linfomas, los mecanismos moleculares implicados en mediar el efecto de APRIL incluyen la activación de NFκB y las MAPKs, así como el aumento de moléculas antiapoptóticas como Bcl2 o Bclx<sub>L</sub> (Planelles y col. 2008). En la tabla I.3 se resumen la expresión de APRIL, BAFF, BCMA y TACI en los diferentes tumores de origen hematopoyético, así como las principales funciones mediadas por APRIL y los mecanismos moleculares implicados.



**Figura I.4-** Modelo de acción de APRIL en células B tumorales



Tipo de cáncer		Expresión ligando/receptor					Suero de pacientes		Mecanismos moleculares	Función	Otras células secretoras de APRIL
		APRIL	BAFF	BCMA	TACI	BAFF-R	APRIL	BAFF			
Tumores de células B	NHL	Líneas celulares	+	+	+	+	+	+	- ↑ Bcl-2, Bcl-xl, c-Myc y Bcl-6 - Activación NFκB - ↓ Bax2 y p53	- ↑ supervivencia - ↑ proliferación	- Neutrófilos infiltrantes
		Tumores primarios	+	+	+	+					
	HL	Líneas celulares	+/-	+	+	+/-			- ↑ Bcl-2, Bcl-xl y c-Myc - Activación NFκB - ↓ Bax2 - HSPGs aumentan la señalización de APRIL	- ↑ supervivencia (BCMA) - ↑ proliferación (TACI y BCMA) - ↓ apoptosis	- Neutrófilos infiltrantes
		Tumores primarios	+	+	+	+					
	LLC	Líneas celulares	+	+	+	+	+		- Activación NFκB (BCMA y TACI) - ↑ Mcl-1	- ↑ supervivencia - ↓ apoptosis	- Neutrófilos y células nurse-like
		Tumores primarios	+	+	+	+					
	MM	Líneas celulares	+	+	+	+	+	+	- ↑ Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1 - Activación NFκB, PI3K/AKT y MAPKs - ↑ c-maf, integrina β7 y ciclina D2	- ↑ supervivencia - ↑ proliferación - ↓ apoptosis	- Osteoclastos en el microambiente de la médula ósea
		Tumores primarios	+	+	+	+					

**Tabla I.3-** Resumen de la expresión de APRIL, BAFF, BCMA y TACI en diferentes tumores de origen hematopoyético, así como las principales funciones y mecanismos moleculares que APRIL desempeña en los mismos.

### 6.3.2- APRIL en tumores sólidos

Inicialmente, la expresión del ARNm de APRIL se encontró en varios tumores sólidos, incluyendo timoma, carcinoma de colon y glioblastoma (Hahne y col. 1998) (Kelly y col. 2000, Roth y col. 2001), y se describió que APRIL era capaz de estimular *in vitro* la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores sólidos, efecto que se reprodujo *in vivo* al inyectar fibroblastos NIH3T3 transfectados con APRIL en ratones inmunodeficientes (Hahne y col. 1998, Kelly y col. 2000). Además, se observó como al inhibir la expresión de APRIL mediante el uso de receptores solubles, se bloqueaba el crecimiento de carcinomas que expresaban la citoquina de manera endógena (Rennert y col. 2000).

En glioblastoma, un tumor sólido del cerebro, también se ha descrito que líneas celulares derivadas de tumores primarios expresan niveles elevados de APRIL y proliferan en respuesta a APRIL, efecto que disminuía al añadir BCMA-Fc (Roth y col. 2001, Deshayes y col. 2004).

En 2006 un estudio caracterizó la expresión de APRIL en tumores sólidos de diferente origen (cervix, colon, hígado, pulmón, riñón, glioblastoma y melanomas), utilizando inmunohistoquímicas de tejidos así como un microarray con 2159 muestras. Los autores de este trabajo encontraron una sobre-expresión de APRIL en el 66% de los tumores analizados, y vieron que las células productoras de esta citoquina son tanto las

células tumorales, como células situadas en el estroma del tumor, siendo los neutrófilos que infiltraban el tumor los productores mayoritarios (Mhaweche-Fauceglia y col. 2006).

En carcinoma de colon, experimentos con ARNi mostraron que APRIL favorece *in vitro* la adhesión, migración e invasión de una línea celular derivada de este tipo de tumores (Ding y col. 2009). Poco después, el mismo grupo demostró usando modelos de xenotransplantes, que APRIL estimula la proliferación a la vez que disminuye la capacidad apoptótica y necrótica de las células tumorales de colon, lo que provoca el aumento de su capacidad metastásica (Wang y col. 2012). En líneas celulares de carcinoma de páncreas, otro órgano del sistema digestivo, también se ha observado que la expresión de APRIL está aumentada y que APRIL promueve su proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*, además de disminuir la apoptosis (Wang y col. 2008). Recientemente se ha descrito que los niveles de APRIL en el suero de estos pacientes se correlacionan de manera directa y significativa con los niveles de marcadores ACE (antígeno carcinoembrionario) y antígeno carbohidrato (CA) 19.9, utilizados para diagnosticar de manera convencional el carcinoma de páncreas (Wang y col. 2011), sugiriéndose el potencial uso de APRIL como factor de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

En cuanto a la expresión de los receptores de APRIL en tumores sólidos, al inicio no se consiguió detectar BCMA ni TACI en las líneas celulares que sobrevivían y proliferaban en respuesta a APRIL, probablemente debido a las limitaciones técnicas del momento (Rennert y col. 2000). Posteriormente, tras describirse que APRIL interaccionaba con los PGHSs, se postuló que estos podrían participar en el efecto mediado por APRIL ya fuera señalizando a través de sus dominios intracelulares, o bien actuando de cofactores para un receptor desconocido (Ingold y col. 2005, Hendriks y col. 2005). En glioblastoma, se detectaron los ARNm de TACI y BCMA (Deshayes y col. 2004), pero no se encontró la presencia de ninguno de los dos receptores en la superficie celular, posiblemente por la ausencia de anticuerpos comerciales adecuados. Hasta el momento, solo una publicación ha detectado la expresión de la proteína TACI pero no de BCMA en tumores sólidos de origen renal (Pelekanou y col. 2011).

En cáncer de mama, pocos son los trabajos que hacen referencia a APRIL. En un estudio mencionado anteriormente (Mhaweche-Fauceglia y col. 2006), entre las 2159

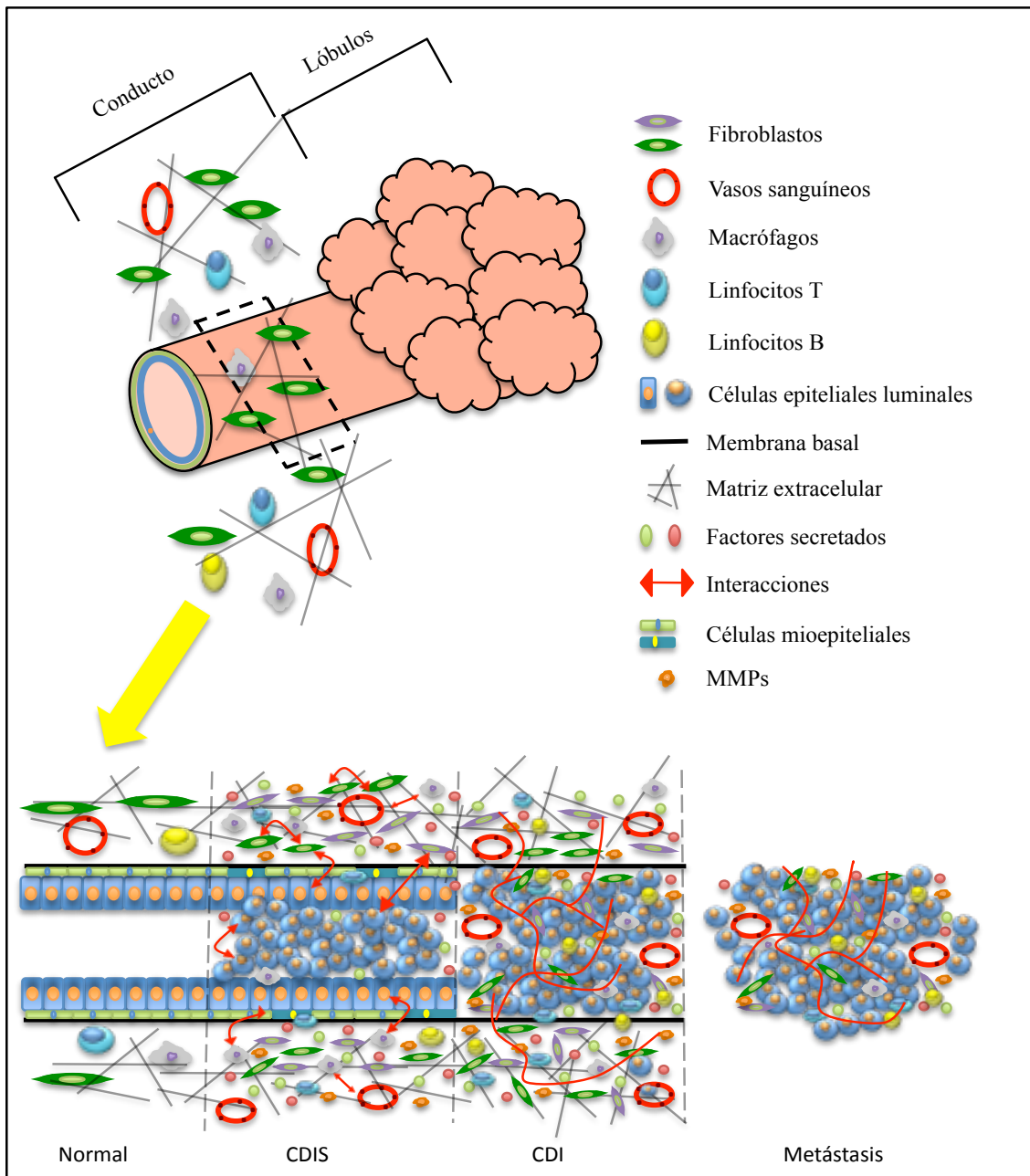
muestras utilizadas se encontraban 130 de carcinomas de mama, en las que se identificó la presencia de células productoras de APRIL en un 39% de los tumores, siendo la expresión mayoritaria en los neutrófilos del estroma tumoral. En 2008, se describió la expresión de APRIL en 52 carcinomas de mama y su correlación inversa con el grado del tumor, ya que se encontró mayor expresión de APRIL en el tejido mamario no canceroso que en el carcinoma ductal *in situ* (CDIS) o el carcinoma ductal invasivo (CDI) (Pelekanou y col. 2008). Poco después, en 2009 otro grupo utilizó los resultados de microarray disponibles en dos bases de datos públicas para estudiar la presencia de APRIL y concluyó que esta citoquina se expresa en carcinomas de mama de manera directa a la progresión de los mismos (Moreaux y col. 2009b). A la vista de estos datos, queda patente la necesidad de nuevas investigaciones que clarifiquen la relevancia de APRIL en cáncer de mama.

## **7- El cáncer de mama**

El cáncer de mama es el tipo de carcinoma más diagnosticado entre las mujeres de Estados Unidos y Europa (DeSantis y col. 2011, Malvezzi y col. 2011) y supone la segunda causa de muerte entre la población femenina. Aunque los hombres también pueden padecerlo, su incidencia es de tan solo el 1% del total de los casos de cáncer de mama diagnosticados. En España, el diagnóstico del carcinoma de mama supone el 30% de los casos de tumores en mujeres.

La glándula mamaria es un tejido complejo que contiene un parénquima de células epiteliales, que forman los ductos colectores, rodeadas de un microambiente compuesto por la matriz extracelular (MEC) y diferentes tipos de células estromales (que incluyen fibroblastos, adipocitos, células endoteliales, macrófagos y mastocitos) que proporcionan las señales necesarias para la correcta proliferación, diferenciación y supervivencia de la glándula completa (Arendt y col. 2010, Place y col. 2011). El epitelio mamario, que contiene células progenitoras y células madre, está formado por una capa interna de células epiteliales lumbinales, rodeada de una capa de células basales mioepiteliales (Visvader 2009). La membrana basal, que recubre al epitelio y lo separa del estroma circundante, influye de manera notable en el desarrollo y biología de la mama (Streuli 2003) (figura I.5). A la vez que el número de células estromales aumenta, disminuye el número de células mioepiteliales y desaparece la membrana basal. Todos

estos acontecimientos dan lugar a la evolución de la mama normal hacia el CDIS (Barsky y Karlin 2005, Polyak y Hu 2005). Estudios moleculares revelan que las células mioepiteliales asociadas al CDIS no son fenotípicamente normales, sino que han perdido algunos de sus marcadores de diferenciación y han regulado a la alza genes promotores de angiogénesis e invasión (Allinen y col. 2004). Cuando la capa de células mioepiteliales y la membrana basal se pierden por completo, se origina un CDI, en el cual las células tumorales pueden invadir tejidos cercanos y emigrar hacia órganos distantes, provocando metástasis (Polyak 2007) (figura I.5).



**Figura I.5-** Estructura de la glándula mamaria y alteraciones del microentorno en la transición de la mama normal hacia CDIS, CDI o tumores metastásicos (Adaptado de Place, A.E. y col, 2011).

### **7.1- MAPKs y cáncer de mama**

En el desarrollo y mantenimiento del cáncer de mama están implicados numerosos mecanismos moleculares, entre los que se encuentran las cascadas de señalización de las MAPKs, que actúan como proteínas traductoras de las señales extracelulares, las cuales amplifican y transmiten al interior de la célula, para finalmente controlar procesos celulares fundamentales, como crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (Dhillon y col. 2007). Anomalías en las rutas de señalización de las MAPKs afectan a las propiedades adquiridas por las células tumorales, por lo que tienen un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer.

Entre las diferentes MAPKs que se encuentran en las células de mamíferos, hay cuatro que juegan un papel fundamental en el cáncer de mama. La proteína ERK1/2 se activa en respuesta a factores de crecimiento y mitogénicos y ha sido asociada con una mayor proliferación, diferenciación, migración, invasión y metástasis en el cáncer de mama (Whyte y col. 2009). La proteína p38, cuya familia consta de cuatro miembros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), que se activan en respuesta a citoquinas inflamatorias y estrés celular. En el cáncer de mama se ha asociado la activación de p38 con una mayor inflamación y también con una mayor capacidad invasiva (Han y col 2002) y supervivencia (Thornton y Rincon 2009) de las células tumorales. En tercer lugar, la proteína JNK, cuya activación en respuesta a estrés celular puede tener efectos opuestos en el cáncer de mama, tales como el aumento de la apoptosis y/o la activación de la proliferación, además de contribuir a la organización tridimensional de las células epiteliales de la glándula mamaria (Whyte y col. 2009). Por último, la proteína ERK5, cuya activación en el carcinoma de mama tiene como consecuencia un aumento en la proliferación celular (Whyte y col. 2009) y la angiogénesis (Montero y col. 2009), además de relacionarse de manera directa con una menor supervivencia de los enfermos (Montero y col. 2009).

### **7.2- Clasificación del cáncer de mama**

La heterogeneidad entre los carcinomas de mama hace que existan diversas clasificaciones atendiendo a los perfiles moleculares, o al análisis inmino-histoquímico

de los mismos (Hergueta-Redondo y col. 2008, Prat y Perou 2011). La principal clasificación establece cinco grupos principales: luminal (que a su vez se subdivide en luminal A y luminal B), basal, HER2+, normal y bajo en claudina. En la tabla I.4 se resumen algunas de las características más importantes de los diferentes subgrupos de carcinomas de mama.

Subgrupos moleculares		%	Características moleculares
RE+ (34-66%)	Luminal A	19-39%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expresión máxima de RE</li> <li>- Baja frecuencia de alteraciones cromosómicas</li> <li>- Baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular</li> <li>- Estadio 1-2</li> <li>- Buen pronóstico</li> <li>- Tratamiento: terapia hormonal</li> </ul>
	Luminal B	10-23%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expresión baja/media RE</li> <li>- Alta expresión de genes relacionados con proliferación y ciclo celular y de genes típicos de los subtipos basal y HER2+</li> <li>- Alta inestabilidad genómica</li> <li>- Estadio 2-3</li> <li>- Mal pronóstico</li> <li>- Tratamiento: terapia hormonal y quimioterapia</li> </ul>
RE- (30-45%)	HER2+	4-10%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sobre-expresión del oncogén HER2</li> <li>- Alta expresión de genes relacionados con la proliferación celular</li> <li>- Mutaciones en TP53</li> <li>- Estadio 3</li> <li>- Tratamiento: quimioterapia con inhibidores de HER</li> </ul>
	Basal	16-37%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- También llamadas triples negativas, por ser RE-, RP-, HER2-</li> <li>- Expresión de genes típicos de células basales/mioepiteliales (CK5, CK6, CK17, P-cadherina...)</li> <li>- Mutaciones en TP53 y BRCA-1</li> <li>- Numerosas alteraciones genómicas</li> <li>- Alta tasa proliferativa</li> <li>- Estadio 3</li> <li>- Mal pronóstico (normalmente metastatiza a cerebro y pulmón)</li> <li>- Tratamiento: quimioterapia</li> </ul>
	Normal	<10%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expresión de genes característicos de células estromales</li> </ul>
	Bajo en claudina	12-14%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baja expresión de genes implicados en las uniones celulares</li> <li>- Alta infiltración de células inmunes</li> <li>- Baja expresión de genes relacionados con proliferación</li> <li>- Alta expresión de genes típicos de células mesenquimales y de la matriz extracelular</li> <li>- Estadio 3</li> <li>- 15-25% pueden expresar receptores hormonales</li> <li>- Mutaciones en BRCA-1</li> </ul>

**Tabla I.4-** Clasificación molecular de los tumores de mama

Además se utiliza en clínica la clasificación tumor/nódulo/metástasis (TNM) (Sobin y col. 1988). El primer parámetro (T), se refiere al tamaño del tumor o a la infiltración local del mismo. Con número del 0 al 4, se describe el tamaño (T1  $\leq$  a 2 cm, T2 si está entre 2 y 5 cm, T3  $>$  5 cm) y T4 si hay expansión hacia la piel o la pared torácica por debajo de la mama. El segundo parámetro que se mide es la afectación de los ganglios linfáticos (N). Se numera de 0 (indica ausencia de infiltración ganglionar) a 3 (N1 si están afectados de 1 a 3 ganglios; N2 si están afectados de 4 a 9 ganglios y N3 si el número es igual o superior a 10 o bien si los ganglios afectados son distantes a la mama). El último parámetro al que se hace referencia es la afectación o no de otros órganos (M). Se numera 0, en ausencia de metástasis, ó 1, con metástasis.

Según la clasificación TNM, el cáncer de mama se agrupa en los siguientes estadios clínicos:

Estadio 0: son lesiones premalignas. Las células tumorales están localizadas exclusivamente en la pared de los lobulillos o de los conductos.

Estadio I (T1, N0, M0)

Estadio II: se subdivide en estadio IIA (T1, N1, M0 o T1, N0, M0 ó T2, N0, M0) y en estadio IIB (T2, N1, M0 ó T3, N0, M0).

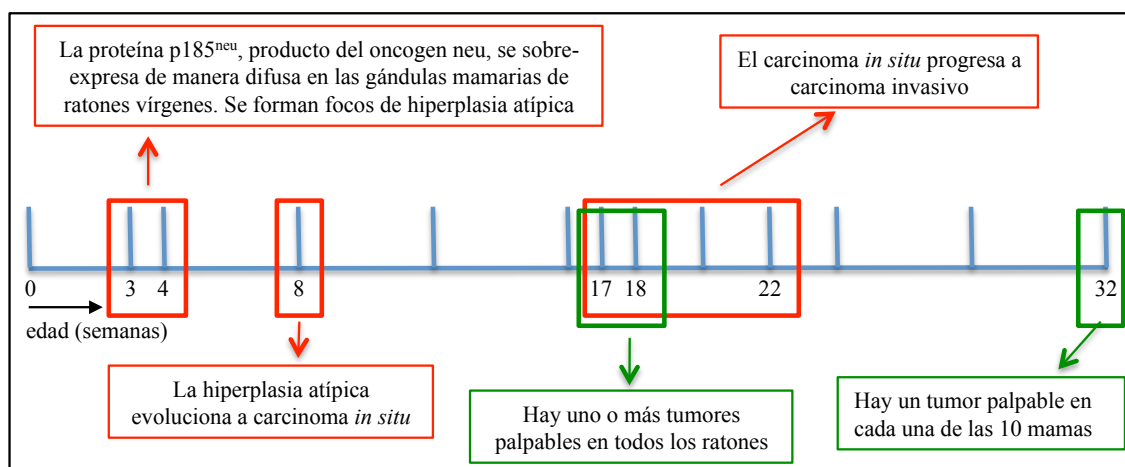
Estadio III: se subdivide en estadio IIIA (T0-2, N2, M0 ó T3, N1-2, M0), estadio IIIB (T4, N0-2, M0) y estadio IIIC (T0-4, N3, M0).

Estadio IV (cualquier T, cualquier N, M1).

### **7.3- Modelos animales para el estudio del cáncer de mama**

Diversos modelos experimentales se han desarrollado en animales para estudiar el cáncer de mama. Los modelos iniciales se basaban en la carcinogénesis química para inducir los carcinomas de mama (Sukumar y col. 1995). Trabajos posteriores utilizaron animales que expresaban diversas proteínas bajo promotores específicos que dirigían la expresión de los genes de interés hacia la mama; es el caso de los promotores MMTV (*mouse mammary tumor virus*) y WAP (*whey acidic protein*). Entre las proteínas frecuentemente expresadas bajo el control de estos promotores se encuentra ErbB2/neu/HER2, sobre-expresada en el 30% de los tumores de mama en humanos (Muller y col. 1988). Es interesante señalar que los adenocarcinomas de mama generados en estos ratones se asemejan en gran medida a los tumores de mama en

humanos (Dimri y col. 2005). En la presente tesis doctoral se han utilizado ratones MMTV-HER2 en fondo genético BALB/c que sobre-expresan el oncogen neu. Las principales características en el desarrollo tumoral se resumen en la figura I.6.



**Figura I.6-** Principales características del desarrollo tumoral en los ratones MMTV-HER2, que sobre-expresan el oncogen neu, en fondo genético BALB/c.

Otros de los modelos tumorales utilizados en ratones son los xeno- y ortotransplantes (Vargo-Gogola y Rosen 2007). En el caso de los xenotransplantes, se inyectan células humanas en ratones inmunodeficientes, para investigar las relaciones tumor-estroma que facilitan la formación y progresión del tumor y para ensayar la efectividad de determinados fármacos en modelos preclínicos (Voskoglou-Nomikos y col. 2003). Los ortotransplantes utilizan células singénicas que se implantan en su localización anatómica normal en ratones inmunocompetentes. La línea celular epitelial de mama 4T1, aislada originalmente en ratones BALB/c que desarrollaron un tumor espontáneo de mama (Dexter y col. 1978, Heppner 1978, Miller y Heppner 1979), ha sido ampliamente utilizada para estudiar los mecanismos implicados en el cáncer de mama y en la metástasis. Cuando el tumor primario es palpable, las células 4T1 ya se han diseminado de manera espontánea a varios órganos distantes (Heppner y col. 2000) y es la metástasis en pulmón la principal causa de la muerte en los ratones con tumores producidos por estas células.







## **OBJETIVOS**



- 1- Caracterizar la expresión y de APRIL y sus receptores, BCMA y TACI, en líneas celulares de cáncer de mama humanas.
- 2- Estudiar *in vitro* el efecto de APRIL sobre la proliferación celular en carcinoma de mama y analizar los mecanismos moleculares subyacentes.
- 3- Investigar la participación de APRIL en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, usando modelos animales tumorales de sobre-expresión y de silenciamiento de APRIL.
- 4- Analizar la expresión de APRIL y sus receptores en tumores primarios humanos de cáncer de mama.



# **MATERIALES Y** **MÉTODOS**





## 1- Líneas celulares

Las distintas líneas celulares utilizadas en la presente tesis doctoral, así como sus medios de cultivo, se detallan en la siguiente tabla (Tabla M.1). Salvo otras indicaciones, todas las células crecieron en incubadores humidificados a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Nombre	Origen	Medio de cultivo	Suplementos y observaciones
MDA-MB-231	Humano	DMEM (Lonza)	Suplementos: 10% FBS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina
MDA-MB-468	Humano	Leibovitz's 15 (Lonza)	Suplementos: 10% FBS, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina Observaciones: crecen sin CO <sub>2</sub>
MCF-7	Humano	MEM (GIBCO)	Suplementos: 10% FBS, L-glutamina 2 mM, 1mM piruvato sódico, 1% NEAA, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina
T47-D	Humano	RMPI 1640 (Lonza)	Suplementos: 10% FBS, L-glutamina 2 mM, 1 mM piruvato sódico, 1,5 g/l bicarbonato sódico, 0,2 U/ml insulina bovina (GIBCO), 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina
MCF-10A	Humano	½ F12 (Lonza) + ½ DMEM	Suplementos: L-glutamina 2mM, 5% suero de caballo, hidrocortisona 0,5 µg/ml (Merck), EGF 20 ng/ml (Peprotech), insulina 10 µg/ml, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina
P943-C	Humano	DMEM	Suplementos: 10% FBS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina
DG75	Humano	DMEM	
4T1	Ratón	DMEM	

**Tabla M.1-** Líneas celulares y medios de cultivo utilizados.

Para despegar las células de la superficie de crecimiento, se lavaron con PBS y se trataron con una solución de tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C. Cuando todas las células estaban despegadas de la superficie, se paró la reacción con PBS, se centrifugaron las células y se eliminó el sobrenadante. El pellet de células se volvió a resuspender en su correspondiente medio de cultivo, y se sembraron las células a la densidad deseada.

## 2- Estimulación de células con APRIL recombinante o ligandos TLR

Se plaquearon las células a una densidad de 10<sup>6</sup> en una placa de 60 mm (BD Falcon) con 2 ml del correspondiente medio de cultivo, o a una densidad de 6.000-7.000 células/pocillo p96 (BD Falcon) y se dejaron adherir a la placa durante 2-3 horas en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, se añadieron los siguientes estímulos a las concentraciones indicadas: APRIL recombinante 0,5 µg/ml (R&D Systems), pIC (20

µg/ml) (InvivoGen), LPS ultrapuro (2 µg/ml) (InvivoGen) y flagelina (0,5 µg/ml) (InvivoGen). Cuando fue necesario, se recogieron los sobrenadantes y los pellets de células a distintos tiempos y se congelaron para su posterior uso.

### **3- Estimulación de células con APRIL para estudiar la señalización celular**

Se plaquearon las células a una densidad de  $8 \times 10^5$  células/p60 mm en medio completo y se dejaron crecer en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron un 60-80% de confluencia, se retiró el sobrenadante, se lavaron con PBS, se añadió medio de cultivo sin suero, y se volvieron a dejar en el incubador durante 24 horas. A continuación, se añadió la proteína APRIL recombinante (0,25µg/ml) y transcurrido el tiempo necesario según el experimento (0min, 5min, 15min, 30min, 60min) se eliminó el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se obtuvieron los lisados celulares tal y como se detalla en un apartado posterior (epígrafe 6).

### **4- Transfección con ARNi**

En primer lugar, se preparó la mezcla compuesta por OptiMem (Gibco) y el conjunto de 4 ARNi específicos para APRIL, TACI, BCMA así como los ARNi control (ON-TARGETplus SMARTpool siRNA, ThermoScientific). Se añadió 2 pmol ARNi/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano o 100 pmol ARNi en una placa p60mm siendo en ambos casos la concentración final de ARNi de 16,7 nM. A continuación se incorporó la lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante y transcurridos 10-20 minutos a temperatura ambiente (RT, *room temperature*) se añadieron las células (6.000 células/100 µl/pocillo o 800.000 células/5ml/p60) en medio de cultivo sin antibiótico. Las células transfectadas se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante el tiempo deseado.

### **5- Preparación de lisados celulares para western blot**

Después de recuperar las células de la placa y lavarlas con PBS, se añadieron al pellet de células 200 µl de tampón de lisis (Complete Lysis-M, Roche) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Complete Lysis-M, Roche). Para asegurar una lisis completa, las células se pasaron por una jeringa (BD Microlance) con una aguja de

25G (BD Microlance), se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos, y se traspasó el sobrenadante a un tubo limpio que se congeló a -80°C hasta su posterior uso. Para la cuantificación de la cantidad de proteína se utilizó el kit “micro BCA” (Pierce), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## **6- Western blot**

Una vez cuantificada la cantidad de proteína de las muestras, se diluyó la misma en tampón de carga de proteínas según el volumen necesario, y se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (30% Acrylamide/bis solution 29:1, Bio-Rad) usando el sistema de BioRad. El gel se corrió a amperaje constante (0,2 mA/gel). La transferencia del gel de poliacrilamida se hizo a una membrana de PVDF (Immobilon-P<sup>SQ</sup> transfer membrane, Millipore), usando tampón de transferencia específico, con el sistema de transferencia en húmedo (BioRad) a voltaje constante (100V) durante 75 minutos. Para comprobar que la transferencia de las proteínas se había llevado a cabo de manera correcta, la membrana se tiñó con rojo Ponceau (Sigma Aldrich).

Antes de la incubación con el anticuerpo correspondiente, la membrana se bloqueó con leche al 5% en tampón de lavado de western blot, durante al menos 60 minutos. En el caso de usar anticuerpos biotinilados, la membrana se bloqueó con fosfobloquer (Phosphoblocker<sup>TM</sup> Blocking Rgnt, Cell biolabs) al 5% en tampón de lavado durante al menos 60 minutos. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en tampón de lavado+BSA 5% (Albumin from bovine serum, Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 4°C en agitación. Después, la membrana se lavó 3 veces, durante 7-8 minutos cada una, y se incubó durante 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario, diluido en tampón de lavado+BSA 5%, a RT y en agitación. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces durante 7-8 minutos cada una, para eliminar el exceso de anticuerpo y se procedió a su revelado, usando la solución ECL (GE Helathcare) según las instrucciones del fabricante.

En la tabla M.2 se resumen todos los anticuerpos primarios y secundarios, así como sus concentraciones, utilizados para western blot en la presente tesis doctoral.

Anticuerpo primario		Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración
Aprily-5 (Alexis Biochemicals)		1:1000	Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (DAKO Cytomation)	1:5000
Tubulina (Sigma-Aldrich)		1:2000		
TACI	(ProSci)	1:500	Polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP (DAKO Cytomation)	1:5000
BCMA		1:200		
P-p38	(Cell Signalling)	1:1000	Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins/HRP (DAKO Cytomation)	1:5000
p38				
P-ERK				
ERK				
P-AKT				
AKT				
JNK				
P-JNK (Invitrogen)				

**Tabla M.2** –Anticuerpos utilizados para *western blot*.

## 7- ELISA de APRIL

Se cuantificó la concentración de APRIL en el medio de células en cultivo (100µl de sobrenadante por muestra) así como en el suero de ratones (100µl de suero por muestra), utilizando un kit de ELISA (Bender Medsystems), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para cuantificar APRIL en el sobrenadante de células en cultivo, se plaquearon  $10^6$  células/1,5ml medio completo/p35 (BD Falcon) y se guardaron en un incubador a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> durante 96 horas, transcurridas las cuales se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -20°C hasta su posterior uso. Para cuantificar APRIL en el suero de ratones APRIL-Tg y ratones control, se extrajo sangre de los animales que se mantuvo primero a RT durante al menos 2 horas y después a 4°C durante un mínimo de 2-3 horas. A continuación se centrifugó a 2.000 rpm, 15 minutos a 4°C y se separó el suero del coágulo de sangre, pasándolo a un tubo limpio y guardándolo a -20°C hasta su posterior uso.

## 8- Inmunofluorescencia

Las células fueron despegadas (tal y como se ha descrito anteriormente) y contadas en una cámara de Neubauer (Brand). Se utilizaron portaobjetos con pocillos de 6 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences), los cuales se tapizaron con

fibronectina (5 µg/ml) (Sigma) durante un mínimo de 30 minutos a 37°C (sin dejar nunca que se seque el pocillo), o durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se lavaron los pocillos con PBS y se plaquearon las células a una densidad de 2000-3000/pocillo en un volumen de 20µl, hasta observar que estaban adheridas al portaobjetos. Después de aspirar el líquido restante en el pocillo y lavar las células con solución de lavado, se fijaron con formaldehído 4% (Ted Pella) durante 12 minutos a 37°C, para después permeabilizarlas con PBS-Staining + 0,2% Tritón X-100 durante 10 minutos a RT en una cámara húmeda. Después se bloquearon las células con solución de lavado + suero de cabra 5% (Chemicon International) + IgG humana 5 µg/ml (Sigma), durante 30 minutos en cámara húmeda. Acto seguido, se lavaron las células y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario preparado en solución de lavado, anti-APRIL (ED-2, 5 µg/ml) (ProSci) a 4°C en cámara húmeda. Después de lavar las células, se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en solución de lavado, goat-anti-rabbit-IgG Alexa 488 (Molecular Probes), 30 minutos a RT, en cámara húmeda y oscuridad. Se realizó un último lavado y se procedió al montaje del portaobjetos con el cubreobjetos (Menzel-Gläser), usando un medio de montaje con DAPI (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal (Olympus Fluoview 1000), y se procesaron utilizando el programa informático Imaje-J.

## **9- Citometría de flujo (preparación y tinción de muestras)**

Las células fueron resuspendidas en PBS-Staining y plaqueadas (0,5-1 x10<sup>6</sup> células/pocillo/100µl) en una placa de 96 pocillos con fondo en V. Tras un paso de bloqueo durante 30 minutos a 4°C con 0,5 µg/pocillo IgG humana o IgG murina (Sigma) (según el origen de las muestras), se realizaron las tinciones superficiales, incubando las células con los anticuerpos primarios correspondientes. Cuando se trató de tinciones intracelulares, las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit “Fixation and permeabilization solution” (B&D Systems), según las instrucciones del fabricante. En ambos casos, las células se incubaron 45 minutos a 4°C y en oscuridad, en 50 µl del anticuerpo primario diluido en PBS-Staining o en solución de permeabilización (Fixation and permeabilization solution, B&D), según se tratara de tinciones superficiales o intracelulares, respectivamente. A continuación se lavaron las células con PBS-Staining o solución de permeabilización (según la tinción fuera

superficial o intracelular) y se incubaron 40 minutos a 4°C y en oscuridad, en 50 µl del anticuerpo secundario diluido en PBS-Staining o en solución de permeabilización (tinciones superficiales o intracelulares, respectivamente). Pasado este tiempo, se lavaron las células con el tampón correspondiente, se resuspendieron en 200 µl de PBS-Staining y se trasladaron a un tubo adecuado para su análisis en el citómetro BD LSRII (Beckton Dickinson) o FACS Calibur (Beckton Dickinson).

Para las tinciones intracelulares se utilizaron los siguientes anticuerpos: BCMA-FITC (R&D Systems), TACI-PE (BD Pharmingen) y APRIL-PE (Biolegend). Además, se llevaron a cabo tinciones para marcadores de superficie con los siguientes anticuerpos: CD19-PE, CD4-PE, CD45-APC (Beckman Coulter), CD11b-PECy7, CD3-biotina, CD3-APC (eBioscience), CD8-PECy7, CD19-AlexaFluor700, CD25-eFluor450 (Biolegend), CD11c (BD Pharmingen), CD45-PE (SouthernBiotech),. Los controles de isotipo que se utilizaron fueron: Rat IgG2-PE, armenian hamster IgG biotina, armenian hamster IgG1-FITC (Beckman Coulter), rat IgG1-FITC (Southern) y rat IgG2-PECy7 (BD).

Los anticuerpos utilizados, así como las combinaciones de los mismos se detallan en la tabla M.3.

Tinción	FITC	PE	APC	PECy7	eFluor450	AlexaFluor700
Células tumorales	BCMA	TACI				
		APRIL				
Tumor	CD11c	CD19	CD45	CD11b		CD3-biot
		CD4	CD45	CD8		CD3-biot
Nódulos linfáticos	CD11c	CD45	CD3	CD11b	CD25	CD19
		CD4	CD3	CD8	CD25	

**Tabla M.3-** Anticuerpos utilizados para citometría de flujo y combinaciones de los mismos.

## 10- Ensayo de viabilidad celular con MTS

Las células se cultivaron a una densidad de 6.000-10.000 (según el tipo celular) resuspendidas en 100 µl de medio, en placa de 96 pocillos de fondo plano y se dejaron adherir 3-4 horas en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se incorporó la proteína recombinante APRIL humana (0,2 µg/ml) y a las 48 horas se añadieron 20µl/pocillo de MTS (Promega). La placa se mantuvo en el incubador de 1 a 4 horas

hasta observar la aparición de color. Entonces, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Sunrise, Tecan).

### **11- Medida de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada**

A las células plaqueadas y tratadas con APRIL recombinante, ARNi o inhibidores de MAPKs, según lo explicado en los diferentes apartados, se les añadió la timidina tritiada (0,5  $\mu$ Ci/pocillo) (GE Healthcare) durante al menos 12 horas. Pasado este tiempo, se lisaron las células mediante congelación/descongelación de la placa para extraer el ADN, el cual se fijó a un filtro de fibra de vidrio (Perkin-Elmer) usando para ello un recogedor de células o *harvester* (PerkinElmer FilterMate<sup>TM</sup>). La cantidad de timidina tritiada incorporada al ADN celular se detectó utilizando un contador de centelleo líquido (Wallac Trilux 1450 Microbeta, Perkin Elmer).

### **12- Medida de proliferación en presencia de los inhibidores de las MAPKs y PI3K**

Se plaquearon las células a una densidad de 6.000cél/pocillo/200 $\mu$ l de medio completo en una placa de 96 pocillos y se dejaron adherir durante, al menos 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el sobrenadante de la placa y se lavaron los pocillos con medio completo, para después añadir 100 $\mu$ l/pocillo de medio sin suero. En estas condiciones, las células estuvieron toda la noche en el incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación se añadieron 10 $\mu$ l/pocillo de cada uno de los inhibidores, o 10 $\mu$ l/pocillo de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma) como control y pasadas 2 horas se añadieron 10 $\mu$ l/pocillo de megaAPRIL (Alexis Biochemicals). La concentración final de cada uno de los inhibidores fue la siguiente: U0126 2,5 $\mu$ M (Sigma Aldrich); SB203580 10 $\mu$ M; (amablemente cedido por la Dra. Ana Cuenda, CNB, Madrid); LY29400 10 $\mu$ M (Clbiochem). A las 36 horas desde la incorporación de los inhibidores se añadieron 0,5 $\mu$ Ci/pocillo de timidina tritiada y se procedió según lo descrito en el apartado anterior.

### 13- Extracción y aislamiento de ARN

El ARN total fue aislado con Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la cantidad de ARN obtenida con un NanoDrop (NanoDrop ND100).

### 14- Retrotranscripción

Siempre que fue posible, se utilizaron 2 µg de ARN para la retrotranscripción con el kit “High-Capacity ADNc Archive” (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (S1000<sup>TM</sup>, BioRad), y las condiciones de la reacción fueron: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

### 15- RT-PCR

Se preparó la mezcla de reacción utilizando MasterMix (5 Prime) y el ADNc procedente de la retrotranscripción, en un volumen final de reacción de 25µl. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 95°C, 10 minutos, 40 ciclos de 95°C 15 segundos y 1 minuto 30 segundos a la temperatura de anillamiento (especificada en la tabla 4) y una última etapa a 72°C durante 5 minutos. Los oligonucleótidos específicos para cada gen, así como sus correspondientes temperaturas de anillamiento se detallan en la tabla 4.

Gen	Oligos (5'-- 3')	Anillamiento
APRIL humano	AAGGGTATCCCTGGCAGAGT	59°C
	GCAGGACAGAGTGCTGCTT	
APRIL murino	GGTGGTATCTCGGGAAGGAC	59°C
	CCCCTTGATGTAAATGAAAGACA	
BCMA murino	TGGTCCTCTCTTTGGCACTT	59°C
	TGATCCTAGTCAGCTCGGTGT	
TACI murino	GAGCTCGGGAGACCACAG	58°C
	TGGTCGCTACTTAGCCTCAAT	
β- actina murina	GGCACCACACCTTCTACAATG	58°C
	TGGATGGCTACGTACATGGCT	
β- actina humana	CCCAGCACAATGAAGATCAA	58°C
	CGATCCACACGGAGTACTTG	

**Tabla M.4-** Oligonucleótidos y temperaturas de anillamiento para RT-PCR y qRT-PCR



## **16- Muestras humanas utilizadas para inmunohistoquímica**

Las muestras humanas utilizadas fueron todas procedentes de adenocarcinomas de mama de origen ductal, de pacientes con edades comprendidas entre los 40 y los 77 años, diagnosticadas en el Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, de enero de 1992 hasta diciembre de 1995, excluyéndose aquellas que tenían tumores en estadio IV (Manes y col. 2003). Se analizaron muestras de estadios I (T1,N0,M0), IIA (T1,N1,M0 ó T2,N0,M0), II-B (T2,N1,M0) y III (T0-2,N2,M0). Que se conservaron en bloques de parafina desde su extracción hasta su posterior uso.

## **17- Inmunohistoquímica**

Los portaobjetos con los cortes de tumores de mama humanos procedentes de bloques de parafina se desparafinaron mediante la inclusión sucesiva en 3 recipientes con xilol durante 3 minutos en cada uno. A continuación, las muestras se hidrataron mediante 3 minutos de inclusión en etanol 100% (x3), 95%, 90%, 70%, 50%, 30%, y finalmente agua destilada. Después se incubaron las muestras 35-45 minutos en tampón citrato previamente calentado a 90°C, se dejaron enfriar y se lavaron. Acto seguido, se bloqueó la peroxidasa endógena con agua oxigenada (Foret) al 3% en tampón de lavado, (40 minutos, RT) y después se bloquearon las uniones inespecíficas, incubando las muestras con 10% de suero de cabra en una solución de BSA al 3% en solución de lavado (40 minutos, RT). Se eliminó el bloqueo y se añadió primero el anticuerpo primario (2 horas, 37°C) y tras 3 lavados, el anticuerpo secundario (40 minutos, RT), ambos diluidos en tampón de lavado. Después de lavar 3 veces, se ajustó el pH a 5,2 con tampón acetato y se reveló la tinción con AEC (Sigma) según las instrucciones del fabricante. A continuación se hizo la contra-tinción con hematoxilina de Mayer's (Sigma) (1min 30seg), después un lavado con agua (5-10 min), y se procedió a su montaje con faramound (Dako). En el caso de las tinciones dobles, antes de revelar con AEC se hace el revelado con el kit "Alkaline phosphatase substrate kit III" (Vector laboratories).

En el caso de los tumores murinos 4T1, teníamos criocortes de las muestras conservadas en OCT, que se fijaron a los portaobjetos con formalina tamponada neutra (Sigma) durante 10 minutos. A continuación se utilizó el kit "M.O.M. kit for detecting

mouse primary antibodies on mouse tissue” (Vector laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante, con las siguientes particularidades: Se bloqueó con un exceso de 2,5 veces del componente “Mouse Ig Blocking Reagent” durante toda la noche. A continuación, tras incubar las muestras con el anticuerpo primario durante toda la noche, se lavaron y se añadió una solución que contenía el componente “M.O.M. Protein Concentrate” del kit y un 50% de suero (de la especie en la que esté hecho el anticuerpo secundario). Transcurridas 2 horas, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario y se continuó con el mismo protocolo utilizado para las muestras procedentes de bloques de parafina.

Los anticuerpos utilizados, así como la concentración de los mismos se detallan en la tabla M.5.

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario		Concentración
Aprily-2 (Alexis)	1:350	Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (DAKO Cytomation)	Alkaline phosphatase (invitrogen)	1:150
TACI (Enzo)	1:50	Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins/HRP (DAKO Cytomation)		1:150
Ki67 (Invitrogen)	1:50			1:150
Vicky-1 (Alexis)	1:50	Mouse anti Rat IgG biotina	Alkaline phosphatase	1:150
TACI-PE (BD-Pharmingen)	1:100	Anti-rat immunoglobulins/HRP		1:150
BCMA-FITC (R&D)	1:2,5	Polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP (DAKO Cytomation)		1:150

**Tabla M.5-** Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica

## 18- Análisis y cuantificación de las imágenes de IHQ

Cuantificamos el porcentaje de área positiva para APRIL, BCMA y/o TACI en las muestras de carcinoma de mama humano haciendo la media de los 7 campos más intensos de cada tinción por muestra. Igualmente, cuantificamos la expresión de Ki67 en los tumores 4T1 murinos, seleccionando los 20 campos más intensos por muestra y calculando la media. El área a la que hace referencia la tinción es el área total del campo (regiones con y sin células), a la que se resta la parte no ocupada por células.

## 19- Obtención de ADN genómico a partir de colas de ratón

Se partió de pequeños fragmentos de colas de ratón, los cuales se digirieron con una mezcla de tampón de lisis y proteinasa K (100µg/ml) (Roche) durante un mínimo de 3 horas, a 37°C y en agitación. A continuación, las muestras se centrifugaron y se trataron con isopropanol (Merck), para precipitar el ADN. Después se procedió a la limpieza del ADN con etanol (Merck) al 70%, y por último se dejaron secar los pellets. Una vez secos se resuspendieron en 100 µl de agua. Para el genotipado de las diferentes líneas de ratón se utilizaron 2 µl del ADN obtenido.

## 20- PCRs para el genotipado de las distintas cepas de ratones

La mezcla de reacción utilizada para amplificar el ADN genómico obtenido a partir de la cola de ratón, se compone de 2µl ADN genómico, 10µl MasterMix (5 Prime), 1µl mezcla de oligonucleótidos 10µM (SIGMA) y 12µl H<sub>2</sub>O. En el caso de la PCR para detectar el gen *neu*, se deben añadir también 0,5µl Mg<sup>2+</sup> 25mM (5 Prime). Los oligonucleótidos, así como las condiciones de amplificación específicas para cada gen, se resumen en la tabla M.6. Una vez obtenidos los productos de PCR, se resolvieron en un gel al 1,5% de agarosa (EuroClone).

Gen	Oligos (5'-- 3')		Condiciones de amplificación
Neu	TTTCCTGCAGCAGCCTACGC		94°C 3min, 12x [94°C 20s, 64°C(-0,5°C en cada ciclo) 30s, 72°C 35s], 25x [94°C 20s, 58°C 30s, 72°C 35s], 72°C 2min, 4°C ∞
	CGGAACCCACATCAGGCC		
APRIL	TCACAGTTTCACAAACCCAGG		94°C 5min, 30x [94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 2min], 4°C ∞
	ATGGATTACAAAGACGATGACG		
APRIL-KO	alelo WT	CCTGACTTCTGAGACCACAGC	95°C 4min, 35x [95°C 30s, 62°C 1min, 68°C 5min], 72°C 6min, 4°C ∞
		GCAGATAAATTCCAGTGTCCC	
	alelo KO	CCTGACTTCTGAGACCACAGC	
		CTCCCACTCATGATCTATAAGATCC	
β-caseína	GATGTGCTCCAGGCTAAAGTT		Cualquiera de las condiciones de amplificación anteriores
	AGAAACGGAATGTTGTGGAGT		

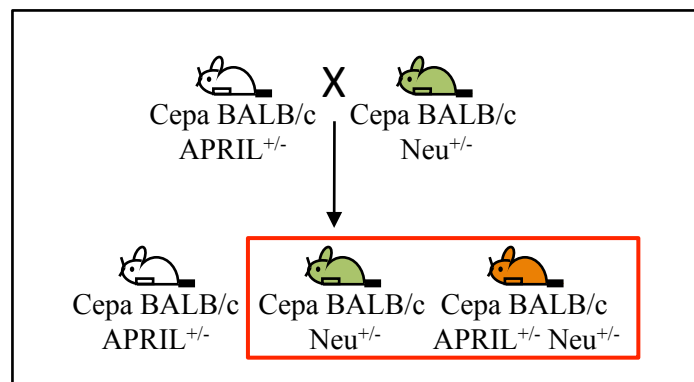
**Tabla M.6-** Oligonucleótidos para genotipaje de ratones y condiciones de amplificación

## 21- Cepas de ratones

Todos los procedimientos realizados en esta tesis doctoral con ratones están de acuerdo con la ley de la Comunidad Europea 86/609/EEC y fueron aprobados por el comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

### 21.1- Generación de ratones MMTV-neu/APRIL transgénicos

Los ratones BALB/c/MMTV-neu (de aquí en adelante MMTV-neu o Neu<sup>+/-</sup>) fueron cedidos por el doctor Guido Forni (*Molecular Biotechnology Center, Department of Clinical and Biological Sciences, Turín*) y los ratones BALB/c-APRIL-Tg (APRIL-Tg, de aquí en adelante) por el doctor Michael Hahne (*Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier CNRS-UMR, Montpellier*). Con el fin de obtener los ratones dobles transgénicos, se pusieron cruces entre machos MMTV-neu y hembras APRIL-Tg y, puesto que ambas líneas portan el transgen en heterocigosis, se analizó la descendencia con el fin de seleccionar los animales hembras que portaran los transgenes APRIL y neu simultáneamente, y como grupo control aquellas que sólo portaran el transgen neu (figura M.1).



**Figura M.1-** Generación de ratones MMTV-neu y MMTV-neu/APRIL-Tg

### 21.2- Generación de ratones APRIL-KO en fondo BALB/c

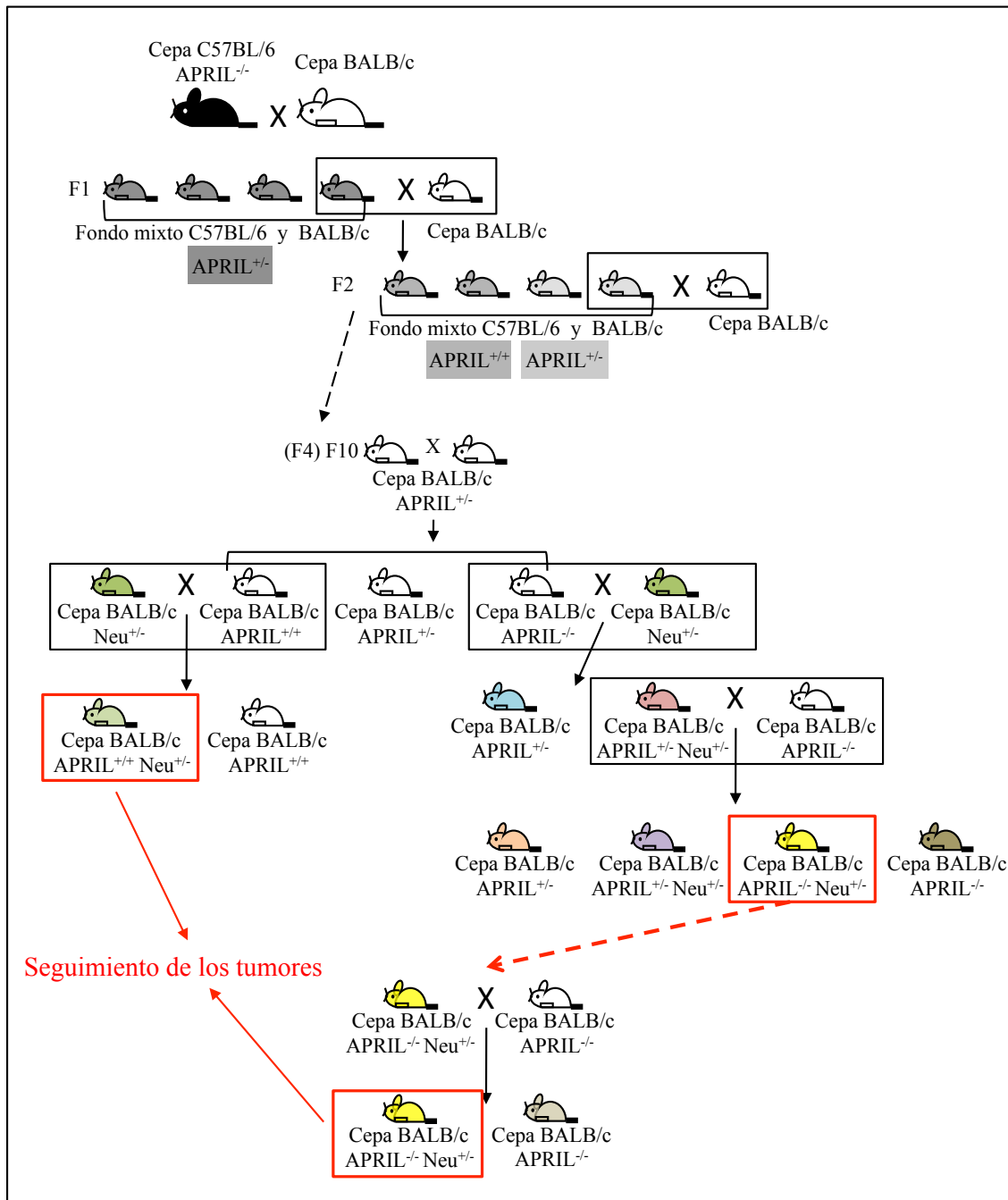
Los ratones APRIL-KO homocigotos en fondo genético C57BL/6 (de aquí en adelante B6-APRIL-KO) fueron cedidos por el doctor Raif Geha (*Harvard Medical School, Boston*). Con el fin de generar esta misma colonia en fondo BALB/c, se iniciaron una serie de retrocruces que comenzaron con un macho de la colonia B6-APRIL-KO y una hembra de fondo BALB/c puro. Obtuvimos una F1 heterocigota para

el alelo *April-KO* en fondo genético mixto (C57BL/6 y BALB/c) y uno de los animales machos lo cruzamos con hembras BALB/c, obteniéndose de esta manera la F2. Tras el genotipaje de la F2, elegimos los ratones portadores del alelo *April-KO*, y los volvimos a cruzar con animales de fondo puro BALB/c. Este proceso se repitió hasta tener la F10, momento en el cual se cruzaron entre si los animales heterocigotos para el alelo *April-KO* ( $APRIL^{+/-}$ ), con el fin de obtener animales homocigotos. De esta manera se obtuvieron los parentales que han dado lugar a la colonia APRIL-KO ( $APRIL^{-/-}$ ) en fondo genético BALB/c (figura M.2).

### 21.3- Generación de ratones APRIL-KO/ MMTV-neu en fondo BALB/c

Se cruzaron hembras homocigotas ( $APRIL^{-/-}$ ) con machos de la colonia BALB/c/MMTV-neu ( $Neu^{+/-}$ ), y se analizó la descendencia, seleccionando los animales que eran a la vez portadores del transgen neu y  $APRIL^{+/-}$ . Machos  $APRIL^{+/-}Neu^{+/-}$  se cruzaron con hembras  $APRIL^{-/-}$ , obteniendo de esta manera los animales  $APRIL^{-/-}Neu^{+/-}$ . Por último, y para generar ratones  $APRIL^{-/-}Neu^{+/-}$  con una mayor eficiencia, se pusieron a cruzar machos  $APRIL^{-/-}Neu^{+/-}$  con hembras  $APRIL^{-/-}$ , donde el 50% de la descendencia tiene el genotipo deseado  $APRIL^{-/-}Neu^{+/-}$ . Los animales control  $APRIL^{+/+}Neu^{+/-}$  se obtuvieron de cruces entre hembras  $APRIL^{+/+}$  (procedentes de la descendencia del cruce entre animales heterocigotos de la F10) y machos  $Neu^{+/-}$  (figura M.2).

Los animales  $APRIL^{-/-}Neu^{+/-}$  y  $APRIL^{+/+}Neu^{+/-}$  usados en los experimentos de seguimiento de tumores realizados en la presente tesis doctoral fueron de generación 4-5, y se generaron de manera análoga a lo explicado anteriormente (figura M.2).



**Figura M.2-** Generación de ratones APRIL-KO y MMTV-neu/APRIL-KO en fondo BALB/c

## 22- Modelos tumorales

### 22.1- Modelo de tumores de mama espontáneos MMTV-neu. Medición de tumores y sacrificio.

A partir de las 12 semanas de edad se comenzaron a palpar dos veces por semana las 10 mamas de las ratonas con los siguientes genotipos: MMTV-neu, MMTV-

neu/APRIL-Tg, MMTV-neu/APRIL-KO. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño suficiente, se comenzó a medir su volumen con un calibre electrónico. De esta manera se fue monitorizando el volumen de cada tumor de manera individual, y cuando la suma de todos ellos (volumen tumoral total) era aproximadamente de 3000mm<sup>3</sup>, se sacrificó al animal, extirpando y pesando sus tumores. Para obtener el volumen del tumor se aplicó la fórmula: volumen (mm<sup>3</sup>)= ancho<sup>2</sup> x longitud /2.

### 22.1.1- Procesamiento del tumor

Una vez sacrificado el animal, se extirpó el tumor y se separaron diferentes fracciones del mismo. Una fracción se colocó en un criomolde (Tissue-Tek, Sakura) al que se le añadió medio de congelación (Tissue freezing medium, Jung) e inmediatamente se colocó en nieve carbónica para su rápida congelación y posterior almacenaje a -80°C. Otro fragmento del tumor, del que posteriormente se extraería ARN, se guardó en un tubo y se introdujo inmediatamente en nitrógeno líquido con el fin de evitar la acción de proteasas, para después almacenarlo a -80°C. Tras la disgregación del tumor de manera mecánica, en un mortero y añadiéndole nitrógeno líquido, se procedió a la extracción de ARN (siguiendo el protocolo detallado anteriormente).

### 22.2- Modelo de ortotransplantes de células 4T-1. Medición de tumores y sacrificio.

Se inocularon 10<sup>5</sup> células 4T1 en la cuarta mama izquierda de las ratonas. Se comenzó con la palpación de esa mama a los 3 días de la inoculación de las células y cuando el tumor alcanzó un tamaño suficiente, se comenzó a medir su volumen con un calibre electrónico, de manera bisemanal, hasta el sacrificio del animal a los 15-32 días post-inoculación, dependiendo del experimento. Tras el sacrificio, se extrajo el tumor así como los nódulos linfáticos drenantes y los pulmones. Las muestras se procesaron como se indica a continuación.

### 22.2.1- Procesamiento del tumor

Una vez extirpado el tumor, se pesó y se separaron diferentes fracciones del mismo. La primera se colocó en un criomolde al que se le añadió medio de congelación e inmediatamente se colocó en nieve carbónica para su rápida congelación y posterior almacenaje a -80°C. El segundo fragmento de tumor, del que posteriormente se extraería ARN, se guardó en un tubo y se introdujo inmediatamente en nitrógeno líquido con el fin de evitar la acción de proteasas, para después almacenarlo a -80°C. El tercer fragmento se utilizó para obtener una suspensión monocelular para su posterior análisis en el citómetro de flujo. Para ello, se utilizó un fragmento de tumor de 0,5-1g, se troceó con ayuda de tijeras y pinzas, y se puso a digerir con 1mg/ml de collagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich) en 2,5ml de RPMI-1640 (Sigma). Después de 1 hora a 37°C y una agitación de 200 rpm, se paró la reacción con PBS + 5% FBS frío, se pasó la mezcla a través de un filtro de 40µm (BD Falcon) y se centrifugó (1300 rpm, 4°C, 8 min). El pellet resultante se resuspendió en 2ml de PBS-Staining.

### 22.2.2- Procesamiento del nódulo linfático

El nódulo linfático que drenaba el tumor se extrajo y se mantuvo a 4°C en PBS + 5%FBS y se disgregó de manera mecánica, haciendo pasar las células a través de un filtro de 40µm (BD Falcon) y añadiendo PBS + 5%FBS frío. Se centrifugó (1300 rpm, 4°C, 8 min), y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS-Staining. Esta suspensión monocelular se tiñó con diferentes anticuerpos (tabla M.3) para identificar distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo

### 22.2.3- Procesamiento del pulmón

Los pulmones se extrajeron y mantuvieron a 4°C en PBS + 5%FBS. Tras hacer las fotos, uno de los pulmones se colocó en un criomolde al que se le añadió medio de congelación e inmediatamente se colocó en nieve carbónica para su rápida congelación y posterior almacenaje a -80°C.



### **23- Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. Se aplicó el test *T-student* para comparar los datos, y cuando el valor *p* resultó menor a 0,05 las diferencias se consideraron estadísticamente significativas. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ .

Los datos de aparición de tumores y de supervivencia de los animales se representan con curvas Kaplan-Meier. Se aplicó el test *Long-rank* para analizar estos datos y se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando el valor de  $p \leq 0,05$ .



**ANEXO I- Composición de tampones y soluciones utilizados**

**1- PBS (10X), 1l**

- 2,56g → NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 11,92g → NaHPO<sub>4</sub>
- 87,66g → NaCl
- 1l → H<sub>2</sub>O milliQ; ajustar pH=6,8

**2- TBS (10X), 1l**

- 87,6g → NaCl
- 12,1g → Trizma-base (Sigma)
- 1l → H<sub>2</sub>O destilada; ajustar pH=8

**3- Tripsina/EDTA**

- 0,05% Tripsina / 0,02% EDTA (en PBS)

**4- Tampón de carga para western blot (100ml)**

- 31,2ml → Tris-HCL pH 6,8 (1M)
- 10g → SDS 100%
- 50ml → Glicerol 87%
- 5ml → β-mercaptoetanol (o DTT 250mM)
- Trazas → azul bromofenol 0,04%
- Enrasar a 100 ml H<sub>2</sub>O

**5- Tampón de electroforesis (10X), 1l**

- 144g → Glicina (Merck)
- 30g → Trizma-base (Sigma)
- 10g → SDS (Sigma)

**6- Tampón de transferencia PVDF (10X), 1l**

- 30,28g → Trizma-base (Sigma)
- 144,12g → Glicina (Merck)
- 1l → H<sub>2</sub>O milliQ

**7- Tampón de lavado western blot/ inmunohistoquímica**

-TBS (1X)/Tween-20 (Sigma-Aldrich) (0,1%)

**8- Solución de lavado para inmunofluorescencia**

-PBS-Staining + 0,05% Tritón X-100 (Pierce)

**9- PBS-Staining (10X), 1l**

-11,35g → Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,08M

-2,48g → NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,018M

-2,15g → NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,018M

-87,66ml → NaCl 1,5M, pH=6,7

Al diluirlo hasta una concentración de 1X, se añade:

-10ml → FBS 1%

-5g → BSA 0,5%

-0,65g → Azida sódica 0,065%

-100ml → PBS-staining 10X

-900ml → H<sub>2</sub>O destilada

**10- Tampón acetato**

Mezclar 26,7ml de la solución A con 100ml de la solución B. Ajustar el pH a 5,2.

- Solucion A: 155,2μl de ácido acético glacial (Panreac) + 27ml de H<sub>2</sub>O destilada.

- Solucion B: 1,36g de acetato sódico- trihidratado (Fluka) en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**11- Tampón citrato**

- 1,47g → Citrato de sodio bihidratado (Fluka) en

- 400ml → H<sub>2</sub>O destilada

**12- Solución stock AEC**

- 40mg → AEC

- 5ml → N,N dimetilformamida (Sigma).

**13- Tampón lisis colitas, 1l**

- 100ml → 100 mM Tris-HCl pH 8.5 (1M)

- 10ml → 5mM EDTA (0.5M)

- 20ml → 0,2% SDS (10%)
- 40ml → 200mM NaCl (5M)
- 830ml → H<sub>2</sub>O destilada



## **RESULTADOS**





## 1- Análisis de la expresión de APRIL y sus receptores, BCMA y TACI en líneas celulares de cáncer de mama humanas

### 1.1- APRIL se expresa en líneas celulares de cáncer de mama

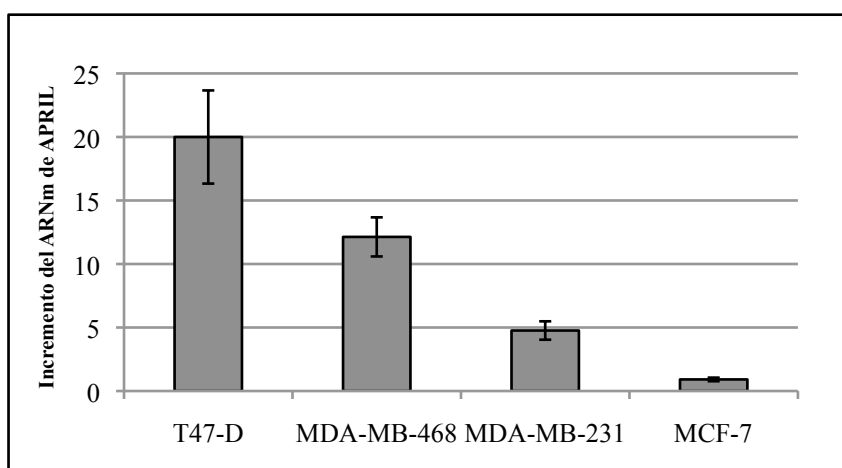
Además de la presencia de ARNm y proteína de APRIL en líneas celulares y tumores primarios procedentes de tumores sólidos de distinto origen, dos trabajos recientes han detectado APRIL en cortes humanos de tejido de carcinoma de mama (Pelekanou y col. 2008, Moreaux y col. 2009). Para investigar la relevancia y función de APRIL en este cáncer epitelial empezamos analizando su expresión en un panel de líneas celulares humanas. Hemos utilizado cuatro líneas celulares que difieren en su localización dentro del tumor y en la expresión de marcadores tumorales como son el receptor de estrógenos (RE $\alpha$ ), el receptor de progesterona (RP) y el receptor ErbB2/Neu (Neve y col. 2006) y cuyas características se indican en la tabla R.1. Hemos incluido las líneas tumorales MDA-MB-231 (basal B) y MDA-MB-468 (basal A), ambas descritas en la literatura como triples negativas (RE $\alpha$ -, RP-, ErbB2-) y que representan un fenotipo tumoral invasivo y agresivo. Además hemos utilizado las líneas luminales T47-D y MCF-7 (RE $\alpha$ +, RP+, ErbB2-), que se corresponden con un fenotipo poco invasivo y menos agresivo. Por último hemos usado una línea epitelial transformada, no tumoral: MCF-10A (RE $\alpha$ -, RP-, ErbB2-).

Localización	Tipo celular	Fenotipo	Marcadores	Invasividad
Luminal	MCF-7	Epitelio luminal	RE+RP+Neu-	Baja
	T47-D	Epitelio luminal	RE+RP+Neu-	Baja
Basal-A	MDA-MB-468	Epitelio luminal/ basal	RE-RP-Neu-	Media
Basal-B	MDA-MB-231	Mesenquimal	RE-RP-Neu-	Alta
	MCF-10A	Epitelial	RE-RP-Neu-	No

**Tabla R.1- Líneas celulares.** Fenotipo, expresión de marcadores e invasividad de las líneas celulares tumorales utilizadas

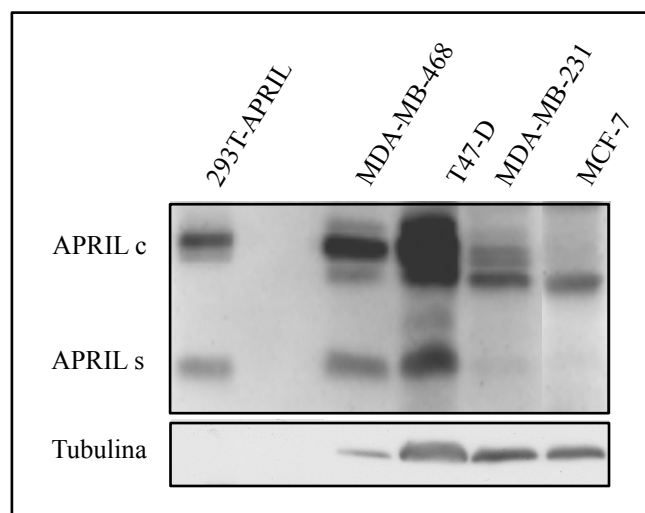
Preparamos muestras de ARN de cada una de las líneas celulares de carcinoma, y las retrotranscribimos a ADNc (ADN codificante) para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative Polymerase Chain Reaction*)

usando oligonucleótidos específicos. Como se muestra en la figura R.1, hay ARNm de APRIL en todas las líneas de carcinoma de mama analizadas. Cuando referimos los datos a las células MCF-7, que tienen los niveles más bajos de ARNm de la citoquina, vemos que la mayor expresión de APRIL se observa en las células T47-D con un incremento de  $19,996 \pm 3,668$  veces, seguida de las células MDA-MB-468 y MDA-MB-231 ( $12,132 \pm 1,539$  veces y  $4,764 \pm 0,725$  veces, respectivamente).



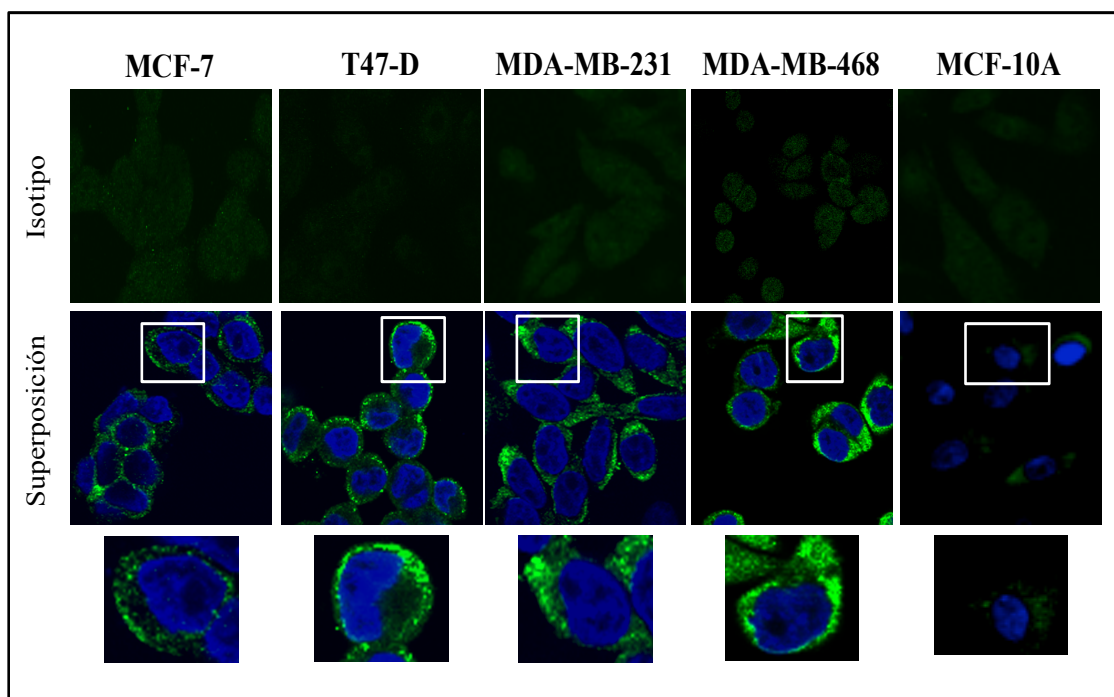
**Figura R.1- Caracterización de los niveles de expresión de ARNm de APRIL en líneas celulares humanas de cáncer de mama.** Medida por RT-qPCR de los niveles de ARNm de APRIL en cuatro líneas celulares de carcinoma de mama (T47-D, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF-7). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la cantidad relativa de ARNm de cada línea celular, referida a las MCF-7. La figura muestra los datos de un experimento representativo ( $n=2$ ) con triplicados de cada una de las muestras (MDA-MB-231,  $n=7$ ; T47-D y MDA-MB-468,  $n=4$ ; MCF-7,  $n=3$ ).

A continuación analizamos la expresión de la proteína APRIL mediante western blot. Para ello usamos un anticuerpo que reconoce tanto la forma completa ( $\approx 30$  KDa) como la forma soluble y biológicamente activa ( $\approx 17$  KDa) de la proteína. Como control positivo, utilizamos células HEK-293T transfectadas con un plásmido que codifica para APRIL. El resultado obtenido confirmó que las cuatro líneas de carcinoma de mama analizadas expresan la proteína APRIL en niveles variables (figura R.2), y muestra que las células T47-D y MDA-MB-468 son las que sintetizan mayores niveles de la proteína en comparación con las células MCF-7 y MDA-MB-231. El triplete que se observa en la forma completa de APRIL, ha sido anteriormente descrito en la literatura (Hardenberg y col. 2007) y puede ser debido a la expresión de las diferentes isoformas de la proteína (Furaya y col. 2011).



**Figura R.2- Expresión de la proteína APRIL en líneas de carcinoma de mama.** Análisis por Western blot de la expresión de las formas completa (APRILc) y soluble (APRILs) de APRIL en lisados celulares obtenidos de células MDA-MB.468, T47-D, MDA-MB-231 y MCF-7. Las células 293-T transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína APRIL humana se usaron como control positivo. La tubulina se utiliza como control de carga.

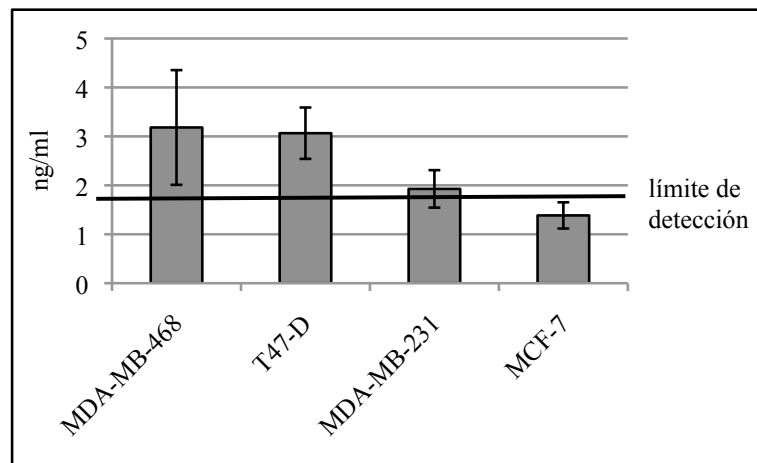
Por otra parte, teñimos las células con un anticuerpo específico para APRIL apropiado para inmunofluorescencia y analizamos su localización mediante microscopía confocal. Tal y como se muestra en la figura R.3, la distribución de APRIL no es homogénea en todo el citoplasma, sino que refleja un marcaje perinuclear, punteado y polarizado, propio del aparato de Golgi, donde se sabe que la citoquina es procesada (Lopez-Fraga y col. 2001).



**Figura R.3- Localización de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama humanas.** Expresión mediante inmunofluorescencia de APRIL en las líneas celulares indicadas (T47-D, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A). En verde se observa la expresión de APRIL (parte inferior) o del control de isotipo (parte superior), y en azul la tinción del núcleo con DAPI.

Después, quisimos cuantificar los niveles de APRIL secretados al medio tras su procesamiento proteolítico intracelular, en cada una de nuestras líneas de carcinoma de mama. El análisis mediante ELISA de los sobrenadantes de las células en cultivo indica que, de acuerdo con los resultados de qPCR e inmunodetección, las células MDA-MB-468 y T47-D son las que secretan más APRIL al medio ( $3,182 \pm 1,172$  ng/ml y  $3,065 \pm 0,525$  ng/ml respectivamente). En las otras dos líneas celulares, el nivel de secreción es inferior o roza el límite de detección del ensayo ( $1,927 \pm 0,383$  y  $1,385 \pm 0,268$  ng/ml para las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente) (figura R.4).

Estos resultados demuestran que diferentes líneas celulares de cáncer de mama expresan y secretan basalmente la proteína APRIL. Aunque hemos analizado un número pequeño de líneas celulares ( $n=4$ ), los resultados indican que no hay una asociación de los niveles de expresión de APRIL con el fenotipo mesenquimal o luminal de las células, la expresión de los receptores hormonales ni tampoco con la capacidad invasiva de las mismas, ya que los diferentes abordajes señalan a las células T47-D (luminales, RE $\alpha$ +, RP+, poco invasivas) y MDA-MB-468 (mesenquimales, RE $\alpha$ -, RP-, muy invasivas) como las principales productoras de APRIL.



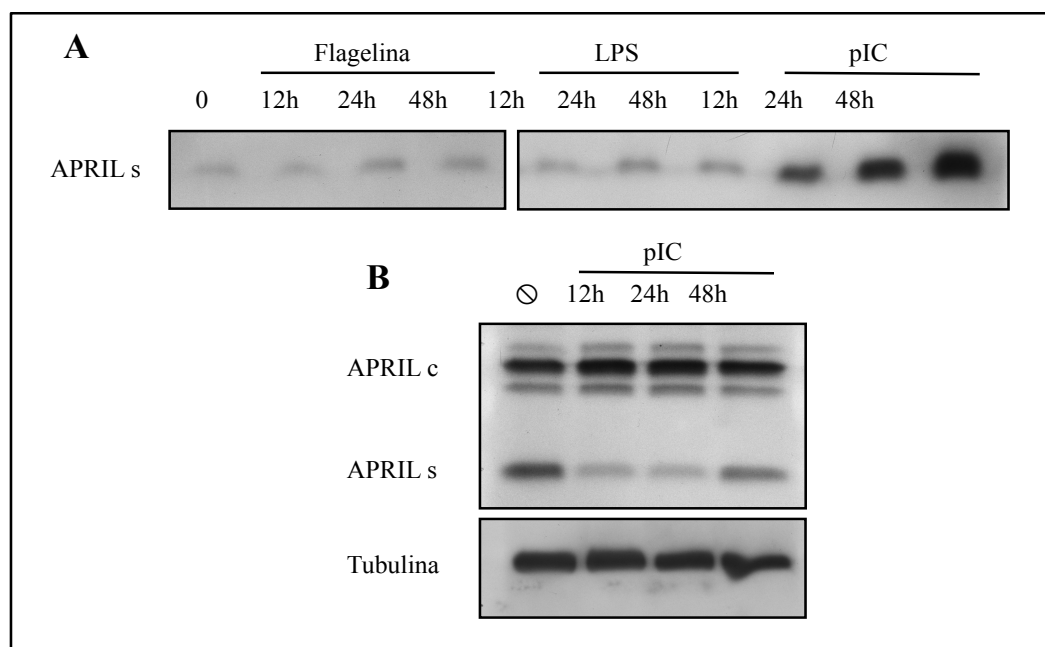
**Figura R.4- Medida de la secreción de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama.** Concentración de APRIL en el sobrenadante de las células MDA-MB-468, T47-D, MDA-MB-231 y MCF7 tras 72 horas de cultivo, cuantificada mediante ELISA. Los datos representan la media (ng/ml)  $\pm$  desviación estándar. La línea negra refleja el límite de detección (1,8ng/ml). La figura muestra los datos de un experimento representativo ( $n=3$ ) con  $n=3$  para cada línea celular, y duplicados de cada una de las muestras.

### ***1.2- Un ligando de la familia de los TLR, pIC, modula la expresión y aumenta la secreción de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama humanas***

La expresión general de TLRs funcionalmente activos en las células tumorales, y la amplia distribución de potenciales ligandos endógenos para los mismos, sugiere que

la señalización mediada por estos receptores puede ser continuamente activada y contribuir así a la progresión tumoral (Huang y col. 2008). En diversos tipos celulares, como las células dendríticas derivadas de monocitos (Hardenberg y col. 2007) y células epiteliales de colon (He y col. 2007) se ha descrito que la secreción de APRIL está aumentada en respuesta a la activación de los TLRs (Hardenberg y col. 2007).

Tras haber visto que células tumorales de mama expresan APRIL, quisimos analizar si los ligandos de los TLRs regulaban su secreción. Para ello, elegimos la línea celular MDA-MB-468, la estimulamos con pIC (ácido poliinosínico-policitidílico), LPS (lipopolisacárido) o flagelina (ligandos de los TLRs 3, 4 y 5 respectivamente) y recogimos tanto los lisados celulares como los sobrenadantes a diferentes tiempos. La figura R.5A muestra que el pIC es capaz de estimular la secreción de APRIL, siendo este aumento notable a las 12 horas y acumulándose de manera progresiva hasta las 96 horas. Al analizar los lisados celulares (figura R.5B), se observa como la forma procesada de APRIL no se acumula dentro de la célula, sino que va disminuyendo durante la estimulación con pIC, lo que puede reflejar un transporte acelerado de APRIL desde el aparato de Golgi hacia el exterior.



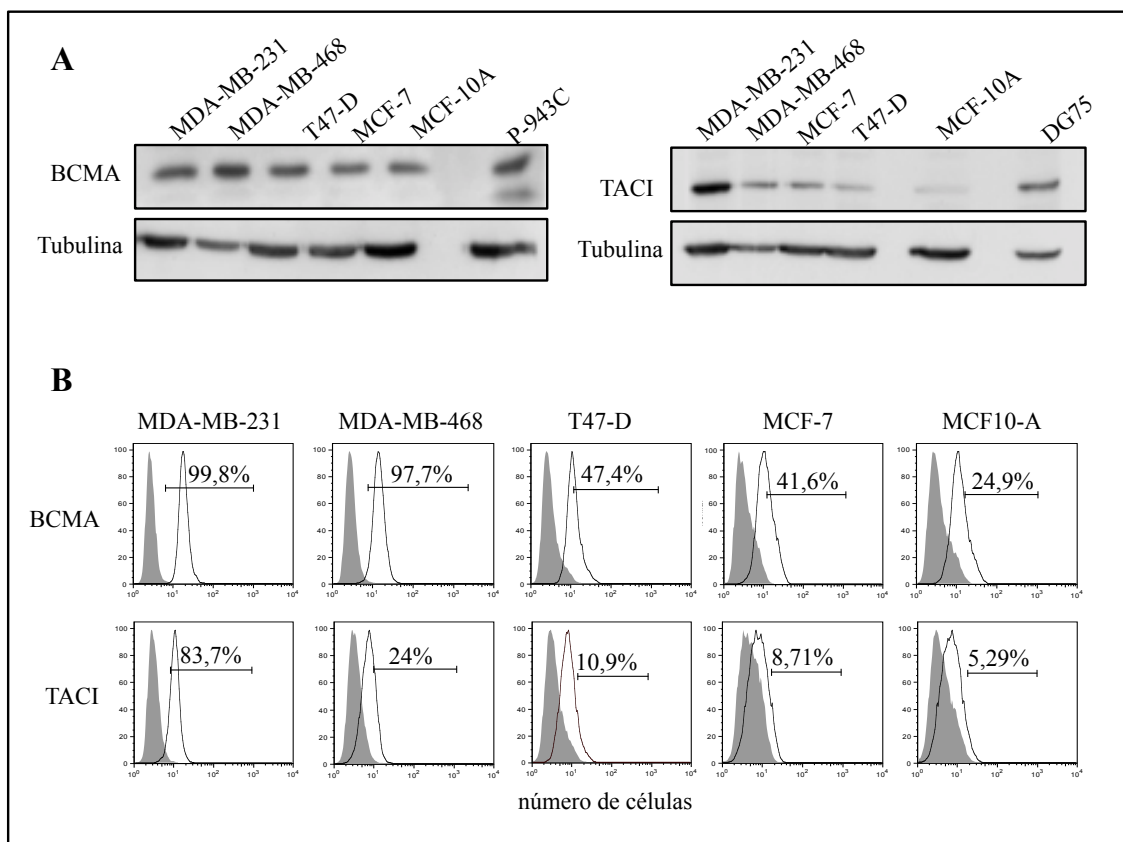
**Figura R.5- Modulación de la expresión de APRIL por ligandos TLR en líneas humanas de carcinoma de mama.** A) Western blot que muestra la expresión de APRIL soluble en el sobrenadante de células MDA-MB-468 sin estimular o estimuladas con 20 µg/ml pIC, 2 µg/ml LPS o 0,5 µg/ml flagelina, durante 12, 24 ó 48 horas. B) Expresión de las formas completa (APRILc) y soluble (APRILs) de APRIL en lisados totales de células MDA-MB-468 sin estimular (x, 48horas) o estimuladas con 20 µg/ml de pIC durante 12, 24 o 48 horas. La tubulina se utiliza como control de carga.

### ***1.3- Los receptores de APRIL, BCMA y TACI, se expresan en líneas celulares de cáncer de mama humanas***

La literatura existente hasta el momento describe la expresión de los receptores para APRIL, BCMA y TACI, en los linfocitos B, en las células plasmáticas, en los tumores originados a partir de estos tipos celulares (Planelles y col. 2008, Kimberley y col. 2009) y en las células madre mesenquimales (Zonca y col. 2011). En cuanto a la presencia de BCMA y TACI en tumores sólidos, es una cuestión todavía por contestar, probablemente debido a la falta de anticuerpos apropiados. En su descripción inicial (Hahne y col. 1998) así como en publicaciones posteriores (Rennert y col. 2000, Deshayes y col. 2004) no se consiguió detectar la proteína de BCMA ni de TACI. Algunos años después se ha visto que líneas celulares procedentes de tumores sólidos como el glioblastoma o el carcinoma de colon (Deshayes y col. 2004), entre otros, expresan el ARNm de ambos receptores. Sin embargo, la expresión de las proteínas BCMA y TACI solo se ha detectado, recientemente, en tumores primarios de origen renal (Pelekanou y col. 2011).

En cáncer de mama no existen datos hasta la fecha acerca de la expresión de BCMA y TACI, por lo que nos propusimos investigarlo en nuestro panel de líneas tumorales, usando como control positivo dos líneas de células B: P-943C y DG75. El *western blot* de la figura R.6A muestra que todas las líneas de carcinoma de mama, así como las células no tumorales MCF-10A expresan los receptores BCMA y TACI de manera variable, siendo los niveles de BCMA aparentemente mayores que los de TACI en todas las líneas, a excepción de las células MDA-MB-231. Mediante citometría de flujo confirmamos estos resultados (figura R.6B), el receptor BCMA se expresa mas que TACI en todas las células, salvo en las MDA-MB-231 donde los niveles de ambos receptores son comparables. Además, observamos que las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 son las que presentan la expresión mas alta de ambos receptores (medida como el porcentaje de células positivas respecto del control de isotipo), seguidas de las células T47-D y las MCF-7. Por último, son las células control MCF-10A las que expresan los niveles más bajos tanto de BCMA como de TACI. Los datos de *western blot* y los de citometría de flujo indican que la expresión de ambos receptores es mayor en las células de carcinoma de mama triples negativas, lo que

sugieren la asociación entre una mayor expresión de los receptores y un fenotipo mesenquimal, más agresivo e invasivo.



**Figura R.6-** Expresión de los receptores BCMA y TACI. **A)** Análisis de la expresión de BCMA (a la izquierda) y TACI (a la derecha) mediante western blot en lisados celulares de las líneas de carcinoma de mama MDA-MB-231, MDA-MB-468, T4-7D, MCF-7 y de la línea epitelial no tumoral MCF-10A. Como control positivo se utilizaron dos líneas de células B: P-943C (en el caso de BCMA) y DG75 (en el caso de TACI) y como control de carga tubulina. **B)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de BCMA y TACI en las mismas líneas celulares de A). Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para BCMA y TACI (en blanco) respecto a sus correspondientes isotipos (coloreados en gris).

## 2- Análisis de la función de APRIL en líneas celulares de cáncer de mama

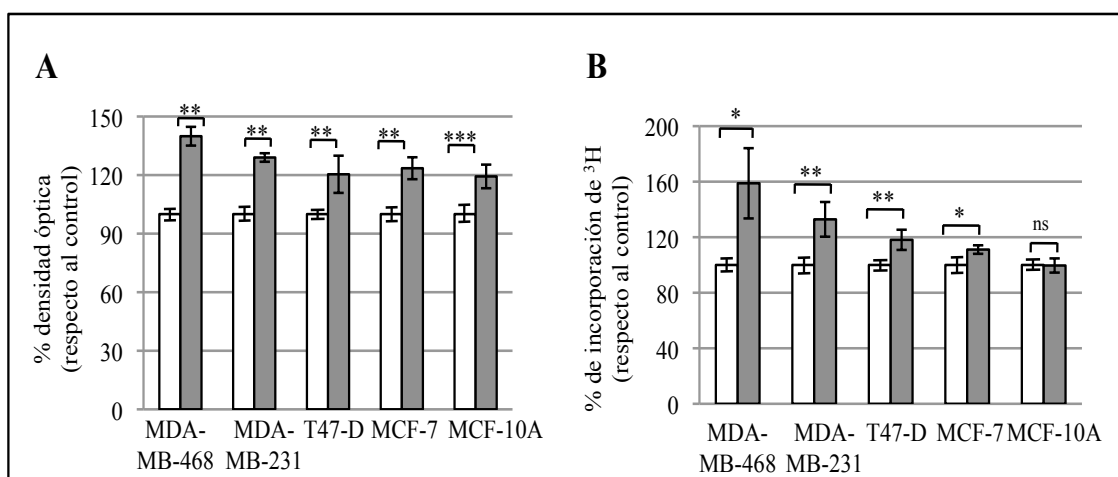
### 2.1- APRIL favorece la proliferación celular

La detección de la expresión de BCMA y TACI en las líneas de carcinoma de mama analizadas, nos llevó a investigar los efectos mediados por APRIL en dichas células. Empezamos analizando la viabilidad y proliferación celular cultivando las células en presencia de APRIL exógeno.

La primera aproximación fue mediante un ensayo MTS que ofrece información acerca de la viabilidad celular, ya que mide actividad metabólica de la célula. Tal y como se muestra en la figura R.7A, todas las líneas celulares analizadas aumentan, de

manera significativa, su viabilidad en respuesta a la estimulación con APRIL. Este incremento es mayor en las células más agresivas e invasivas ( $139,9 \pm 4,8\%$  y  $129 \pm 2,19\%$  en las células MDA-MB-468 y MDA-MB-231 respectivamente), que en el resto de líneas celulares analizadas ( $12,4 \pm 9,53\%$ ,  $123,5 \pm 5,62\%$  y  $119,3 \pm 6,05\%$  en las células T47-D, MCF-7 y MCF-10A, respectivamente).

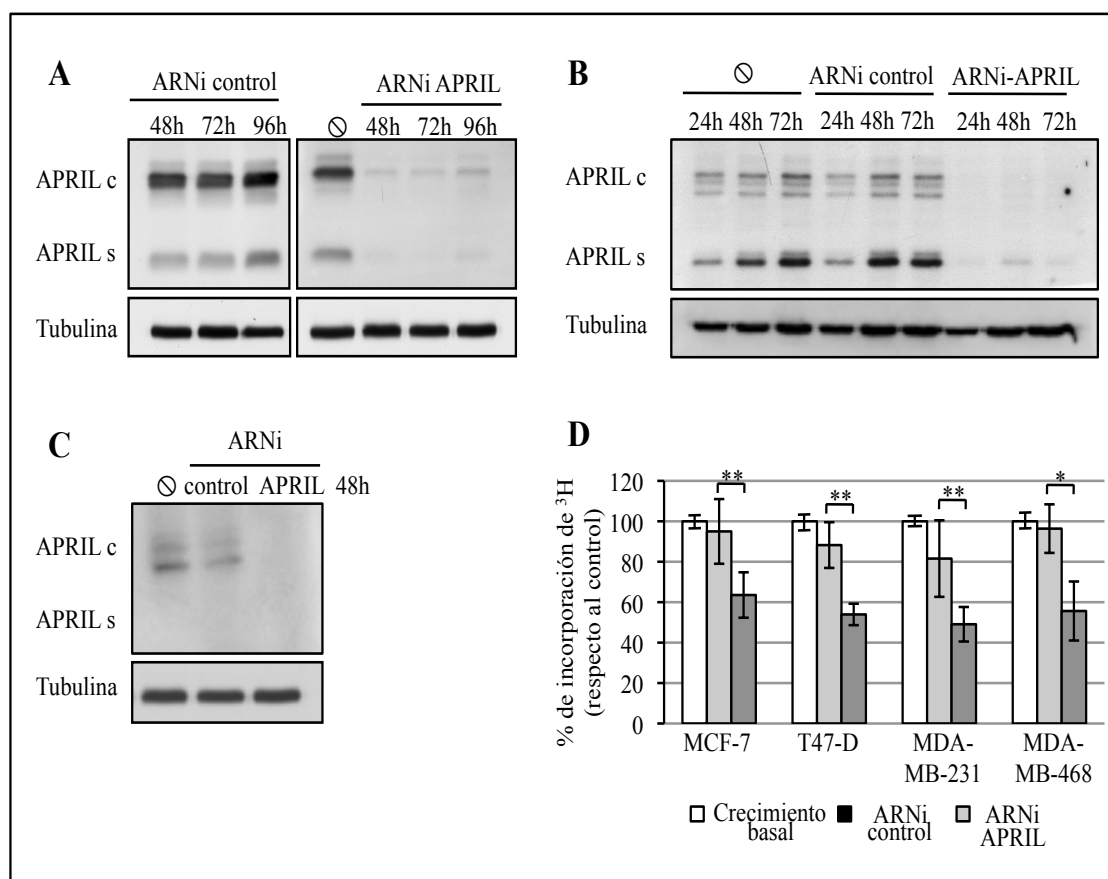
A continuación, y para corroborar que el efecto observado en el ensayo MTS es reflejo de la proliferación celular, realizamos un experimento de incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ), utilizando las mismas condiciones que en el ensayo anterior. Como muestra la figura R.7B, APRIL promueve de forma significativa la proliferación en las cuatro líneas de carcinoma de mama analizadas, con un efecto más pronunciado en las células MDA-MB-468 y MDA-MB-231 ( $159 \pm 25\%$  y  $133 \pm 12\%$  respectivamente) que en las células MCF-7 y T47-D ( $118 \pm 7\%$  y  $111 \pm 3\%$  respectivamente). En las células control MCF-10A, APRIL no induce proliferación, por lo que el efecto observado en el ensayo MTS sería reflejo de una mayor supervivencia. Estos datos demuestran que APRIL promueve la proliferación *in vitro* de células de cáncer de mama, y en consonancia con la expresión de sus receptores, este efecto es mas pronunciado en las células triples negativas, lo que nos permite sugerir la conexión entre la vía de activación de APRIL y la agresividad e invasividad de las células tumorales.



**Figura R.7- APRIL favorece la proliferación celular.** **A)** Ensayo MTS. Las células MDA-MB-468, T47-D, MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A se estimularon con la proteína APRIL recombinante (■) y se midió su viabilidad a las 48 horas. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron frente a los obtenidos en las células sin estimular (□) (100%). **B)** Medida de la proliferación celular mediante incorporación de timidina tritiada después de 48 horas de estimulación de las células MDA-MB-468, T47-D, MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A con la proteína APRIL recombinante. En ambas figuras, cada columna representa la media de los valores obtenidos en 5 experimentos independientes ( $n=16$  en cada experimento) media  $\pm$  desviación estándar (Test *T-student*, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , \*\*\* $p \leq 0,005$ ).



Para investigar el papel de la proteína APRIL endógena en el crecimiento basal de líneas celulares de carcinoma de mama, bloqueamos su expresión mediante el uso de un conjunto de cuatro ARN de interferencia (ARNi) específicos. Las figuras R.8A, 8B y 8C (MDA-MB-468, T47-D y MDA-MB-231 respectivamente) muestran como el ARNi de APRIL disminuye la expresión de la proteína de manera eficiente en las distintas líneas celulares. A continuación, analizamos el crecimiento de las células en estas condiciones mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada y vimos una reducción significativa de la proliferación basal en las cuatro líneas tumorales ( $50,91 \pm 8,54\%$ ,  $46,06 \pm 5,30\%$ ,  $44,37 \pm 14,60\%$  y  $36,45 \pm 11,24\%$  en las células MDA-MB-231, T47-D, MDA-MB-468 y MCF-7 respectivamente) (figura R.8D). Estos datos indican que las células de cáncer de mama secretan basalmente APRIL, citoquina que utilizan de manera autocrina para promover su proliferación.

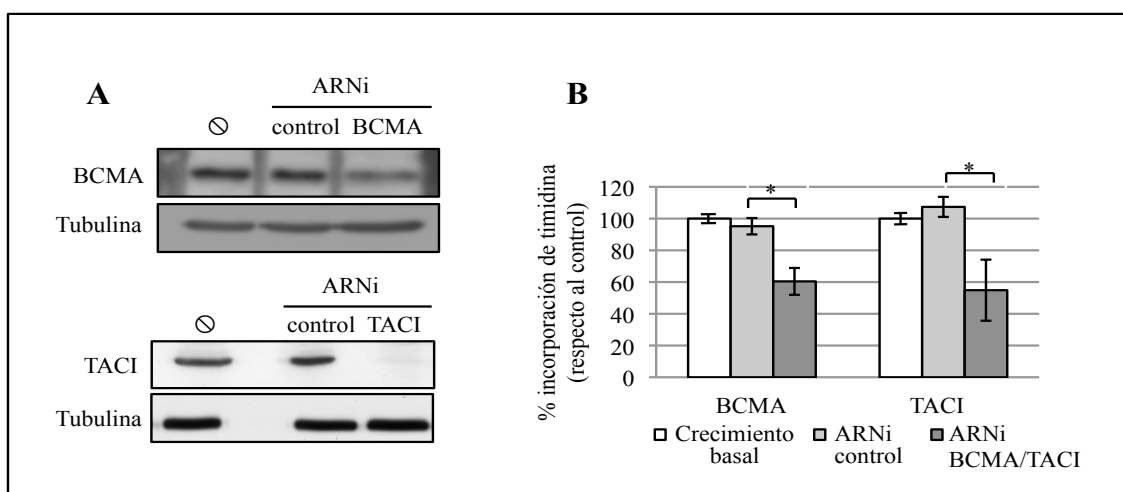


**Figura R.8- La proteína APRIL endógena favorece la proliferación celular.** Análisis mediante western blot de la expresión de las formas completa (APRILc) y soluble (APRILs) de APRIL en células A) MDA-MB-468 B) T47-D C) MDA-MB-231 sin tratar (⊙) o tratadas con ARNi-APRIL ó ARNi-control los tiempos indicados. Tubulina representa el control de carga. D) Medida de la proliferación celular mediante incorporación de timidina tritiada en las líneas celulares anteriormente mencionadas, transfectadas o no, durante 48 horas con ARNi. Cada columna representa la media de los valores obtenidos en 3 experimentos independientes (para cada línea celular, n=16 en cada experimento)  $\pm$  desviación estándar (Test T-student, \*p<0,05, \*\*p<0,005).

## 2.2- APRIL media la proliferación celular a través de BCMA y/o TACI en células de cáncer de mama humanas

Puesto que los dos receptores de APRIL, BCMA y TACI, se expresan en nuestro panel de líneas de carcinoma de mama, nos preguntamos cual de ellos estaría mediando el efecto promotor de proliferación de la citoquina. Para ello, llevamos a cabo experimentos de silenciamiento de BCMA y TACI mediante ARNi específicos, utilizando las células MDA-MB-231, que tienen los niveles mas altos de ambos receptores. La figura R.9A muestra, mediante *western blot*, la eficiencia de los ARNi de BCMA y TACI a las 48 horas de transfección. En esta figura observamos que la expresión de BCMA disminuye de manera parcial, mientras que la de TACI lo hace de manera dramática.

A continuación analizamos el crecimiento basal de las líneas celulares tras la reducción de la expresión de los receptores. Los ensayos de incorporación de timidina muestran que el silenciamiento de BCMA y/o TACI disminuye la proliferación de las células MDA-MB-231 en niveles similares ( $39,57 \pm 8,46\%$  y  $45,12\% \pm 19,25\%$  respectivamente) (figura R.9B). Este resultado muestra que tanto BCMA como TACI pueden promover la proliferación de las células de cáncer de mama mediada por APRIL.



**Figura R.9- APRIL media la proliferación a través de BCMA y TACI.** **A)** Expresión de BCMA (parte superior) y TACI (parte inferior) en la línea MDA-MB-231 sin tratar (⊙) o transfectadas durante 48 horas con ARNi-control, ARNi-BCMA o ARNi-TACI. Tubulina representa el control de carga. **B)** Medida de la proliferación celular de la línea MDA-MB-231 mediante incorporación de timidina tritiada después de la transfección con ARNi BCMA o ARNi TACI durante 48 horas. Cada columna representa la media de los valores obtenidos en 2 experimentos independientes (para cada línea celular, n=16 en cada experimento)  $\pm$  desviación estándar (Test *T-student*, \* $p \leq 0,05$ ).

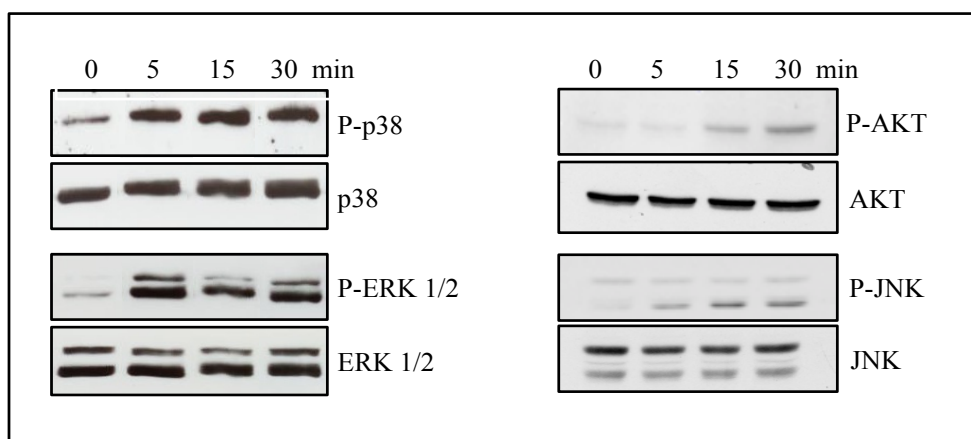
### 3- Análisis de las vías de señalización activadas por APRIL en líneas celulares de cáncer de mama

#### 3.1- *APRIL activa las rutas de señalización de AKT, así como de las MAPKs p38 y ERK*

Las proteínas quinasas MAPKs y PI3K, entre otras muchas, participan en complejas cascadas de señalización celular que modulan la expresión de cientos de genes y que afectan a la supervivencia, diferenciación, proliferación y muerte celular entre otros muchos efectos (Whyte y col. 2009). En cáncer es necesario el perfecto funcionamiento de estas vías de señalización, ya que su activación constitutiva o defectuosa contribuye a la creación y mantenimiento del fenotipo tumoral.

Los resultados obtenidos anteriormente señalan que APRIL promueve la proliferación celular en líneas de carcinoma de mama, por lo que nos propusimos investigar las rutas de señalización activadas por esta citoquina, responsables del efecto observado.

Con este propósito, estimulamos con APRIL las células MDA-MB-231 que expresan altos niveles de BCMA y TACI, y analizamos mediante *western blot* las cinéticas de fosforilación de las MAPKs (p38, ERK1/2 y JNK1/2), así como de AKT. En la figura R.10 se observa que APRIL induce una rápida fosforilación de las MAPKs p38 y ERK1/2 (a los 5 minutos), así como de AKT (a los 15 minutos). Por el contrario, la estimulación con APRIL no activa JNK1/2 (la banda que se observa en el panel de P-JNK corresponde a la proteína P-ERK2, que es reconocida por el anticuerpo anti-JNK). Estos datos indican que en células de carcinoma de mama, tanto la ruta de PI3K como la de las MAPKs, p38 y ERK1/2, se activan en respuesta a APRIL.

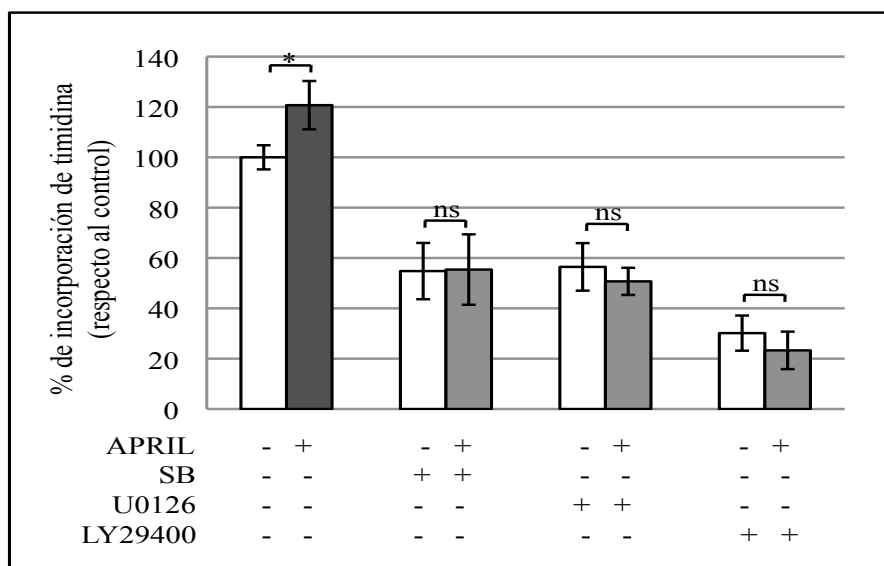


**Figura R.10- APRIL activa las rutas de señalización de AKT y las MAPKs p38 y ERK 1/2.** Western blot representativos (n=3) mostrando la fosforilación de p38, ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y AKT (Ser473) en células MDA-MB-231 después de la privación de suero durante 24 horas, y la estimulación con APRIL (5, 15, 30 minutos, 37°C).

### 3.2- APRIL promueve la proliferación celular a través de PI3K, p38 y ERK

A continuación, quisimos investigar la implicación de las rutas de señalización de p38, ERK y PI3K, en el efecto promotor de la proliferación de APRIL. Para eso, medimos la proliferación de las células MDA-MB-231 en respuesta a APRIL, tratando las células con inhibidores específicos de las quinasas p38 (SB203580), ERK1/2 (U0126) y PI3K (LY29400).

En primer lugar, tratamos las células con los inhibidores de estas proteínas, y comprobamos que, como es de esperar, esta disminuye ( $45,20 \pm 11,19\%$ ,  $43,54 \pm 9,44\%$  y  $69,85 \pm 6,99\%$  con SB203580, U0126 y LY29400 respectivamente) respecto a la obtenida en las células sin tratar. A continuación, tratamos las células de manera simultánea con APRIL y cada uno de los inhibidores, y vimos que la proliferación de las células no aumenta, sino que se encuentra en niveles similares o más bajos ( $44,60 \pm 13,99\%$ ,  $49,29 \pm 5,39\%$  y  $76,71 \pm 7,44\%$  utilizando SB203580, U0126 o LY29400 + APRIL de manera simultánea, respectivamente), que los obtenidos en presencia de los inhibidores solos. Los resultados de la figura R.11 muestran que APRIL no induce la proliferación de las células MDA-MB-231 cuando las proteínas PI3K, p38 y ERK1/2 están inhibidas, lo que indica que el efecto de esta citoquina sobre el crecimiento celular es dependiente de la PI3K y de las MAPKs p38 y ERK1/2.



**Figura R.11- APRIL favorece la proliferación a través de las rutas de PI3K y de las MAPKs p38 y ERK1/2.** Las células MDA-MB-231 se cultivaron en presencia o ausencia del inhibidor de PI3K (LY29400, 10 $\mu$ M), de p38 (SB) o de ERK1/2 (U0126, 2,5 $\mu$ M), y se estimularon con y sin APRIL durante 48 horas. La figura muestra el porcentaje de proliferación obtenido al normalizar el valor de cpm de cada grupo respecto al de las células sin ningún tratamiento. Cada columna representa la media de los valores de 3 experimentos independientes (para cada condición, n=16 en cada experimento)  $\pm$  desviación estándar (Test *T-student*, ns= no significativo, \* $p \leq 0,05$ ).

#### 4- Caracterización de la función de APRIL en modelos murinos de cáncer de mama

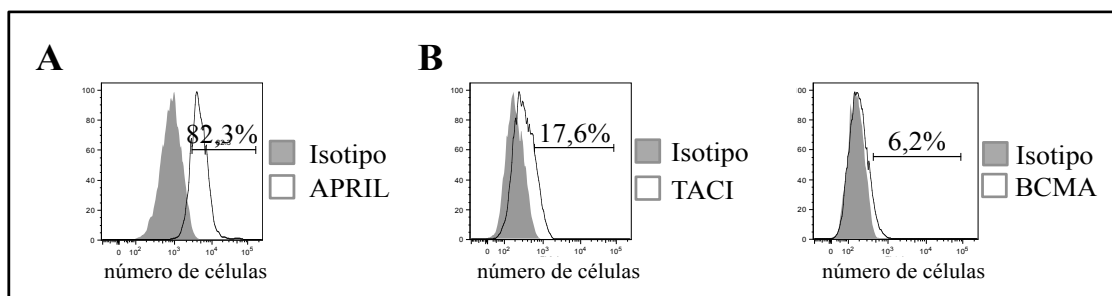
##### 4.1- APRIL promueve el crecimiento de tumores de mama inducidos por la inyección ortotópica de células 4T1

Los modelos de ortotransplante son de gran utilidad para estudios tumorales ya que mimetizan algunas de las características del cáncer en humanos. En estos modelos, se usan ratones inmunocompetentes a los que se implantan células tumorales singénicas en su localización anatómica normal. Hemos utilizado células 4T1, aisladas de tumores de mama de ratones BALB/c (Dexter y col. 1978). Tras el implante, las células 4T1 forman tumores primarios palpables y se diseminan a varios órganos distantes siendo la metástasis en pulmón la principal causa de la muerte en los ratones (Heppner y col. 2000).

#### 4.1.1- Modelos de ortotransplantes de células 4T1 en ratones APRIL-Tg

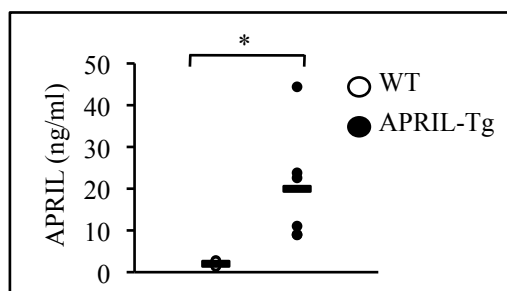
Con el fin de investigar si APRIL estimula la proliferación de células tumorales *in vivo*, uno de los abordajes utilizados fue analizar el crecimiento de células 4T1 en un contexto de sobre-expresión de APRIL, usando para ello ratones APRIL-Tg.

En primer lugar, caracterizamos la expresión de APRIL, BCMA y TACI en las células 4T1 mediante citometría de flujo y observamos que el 82,3% de las células expresan la proteína APRIL murina (figura R.12A). Del mismo modo, vimos que las células 4T1 expresan tanto TACI como BCMA (17,6% y 6,2% de células positivas para cada receptor respectivamente) (figura R.12B). El hecho de que las células tumorales 4T1 expresen los receptores para APRIL, indica que pueden responder al ligando, y que por tanto son útiles para los ensayos de inducción de tumores en ratones APRIL-Tg.



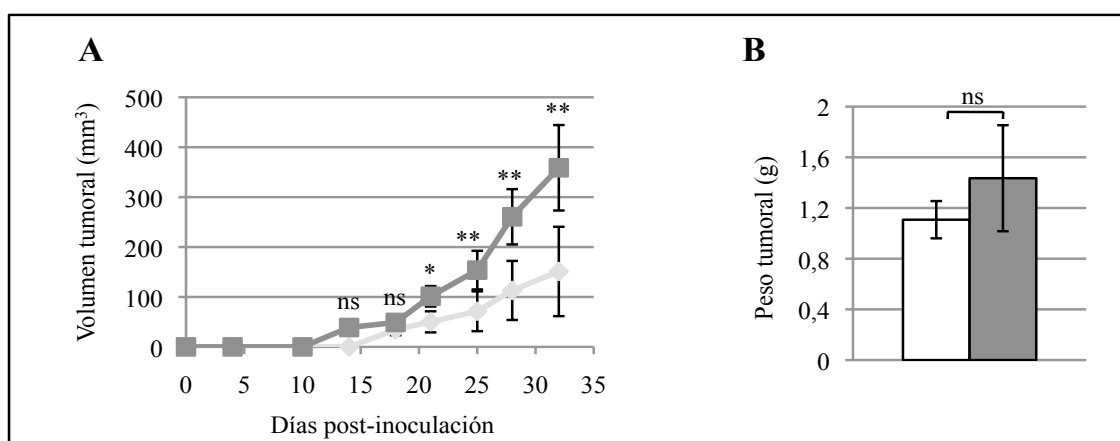
**Figura R.12- Expresión de APRIL y sus receptores en células 4T1.** Análisis por citometría de flujo de la expresión de APRIL, BCMA y TACI en las células 4T1. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para **A)** APRIL, **B)** TACI (izquierda) y BCMA (derecha), respecto a sus correspondientes isotipos (histogramas coloreados en gris).

A continuación, analizamos mediante ELISA los niveles de APRIL humana en el suero de los ratones APRIL-Tg y encontramos una concentración de  $19,96 \pm 13,71$  ng/ml de APRIL (figura R.13C). Este dato indica que APRIL se distribuye por el torrente sanguíneo y que por tanto, podría llegar hasta los tumores 4T1 inducidos en las mamas de estos ratones.



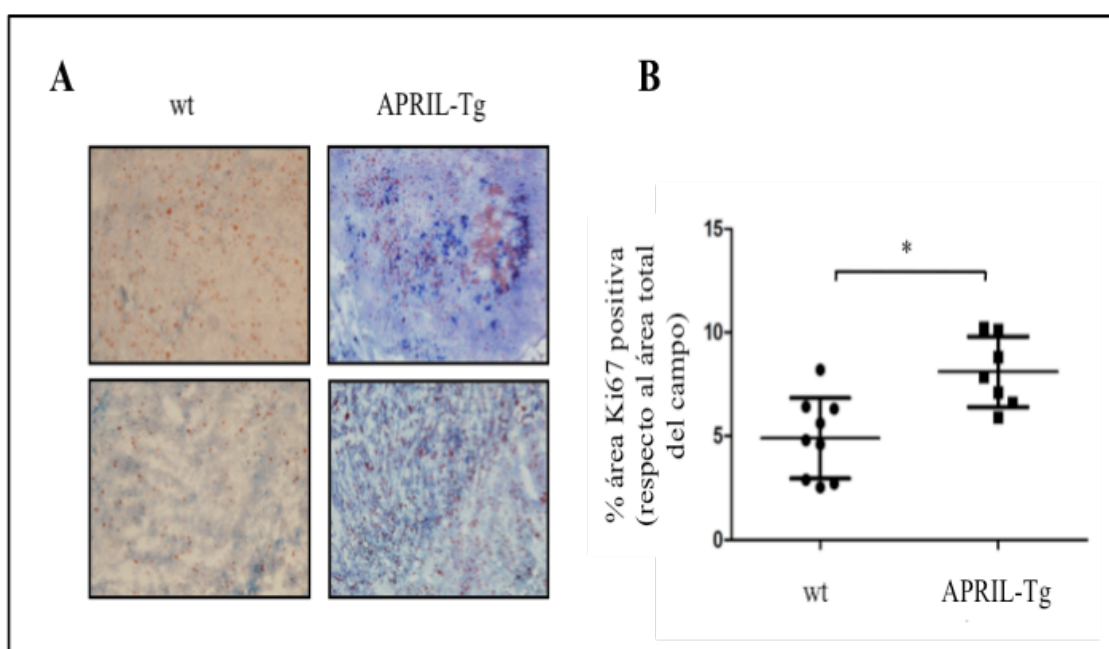
**Figura R.13-** Niveles de APRIL circulante en ratones APRIL-Tg. Concentración de APRIL humano en el suero de ratones *wt* (n=6) y APRIL-Tg (n=6) detectada mediante ELISA. Test *T-student*,  $p=0,02$ .

Inoculamos  $10^5$  células 4T1 en ratones control (*wt*, *wild type*) (n=6) y en ratones APRIL-Tg (n=6), y realizamos un seguimiento del crecimiento tumoral. En la gráfica que se presenta en la figura R.14A se refleja el volumen del tumor y se observa que desde la primera medición hay un incremento del volumen tumoral en los ratones APRIL-Tg respecto del grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas desde el día 21 post-inoculación en adelante (test *T-student*,  $p=0,026$ ,  $p=0,005$ ,  $p=0,001$  y  $p=0,002$  para los días 21, 25, 28 y 32 respectivamente). En el momento del sacrificio de los animales (día 32 post-inoculación), se extirparon y pesaron los tumores (figura R.14B) y comprobamos que el peso de los mismos es mayor en ratones APRIL-Tg que en ratones *wt* ( $1,44 \pm 0,42\text{g}$  y  $1,11 \pm 0,15\text{g}$  respectivamente), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (test *T-student*,  $p=0,219$ ).



**Figura R.14-** Crecimiento de los tumores 4T1. Se inocularon  $10^5$  células 4T1 en ratones *wt* (□) (n=6) y APRIL-Tg (■) (n=6) y se siguió su crecimiento. **A)** Medición del volumen tumoral a lo largo del experimento. Cada punto representa la media del volumen del tumor de todos los animales  $\pm$  desviación estándar (volumen= (ancho<sup>2</sup> x largo)/2 ). **B)** Peso del tumor. Una vez sacrificados los animales, se extirpó el tumor y se pesó; test *T-student*,  $p=0,219$ . Cada columna representa la media del peso del tumor de todos los animales  $\pm$  desviación estándar (Test *T-student*, ns= no significativo,  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,005$ ). Experimento representativo de 3 realizados.

A continuación, para investigar si APRIL era responsable del mayor crecimiento de los tumores 4T1 en los ratones APRIL-Tg, analizamos la expresión de la citoquina y los niveles de proliferación dentro del tumor. Para ello, mediante técnicas de inmunohistoquímica, teñimos cortes de estos tumores con anticuerpos específicos frente a APRIL humano y al marcador de proliferación Ki67. En la figura R.15A se muestran imágenes representativas de las tinciones, en las que vemos que APRIL humano se expresa en los tumores 4T1 de los ratones transgénicos (n=10), en los cuales hay, además, una clara expresión de Ki67. Al cuantificar los niveles de Ki67 (% de área positiva para la tinción nuclear x 20 campos/tumor x 10 animales/grupo) observamos que en los tumores de los ratones APRIL-Tg hay un aumento en la tasa de proliferación (mayor % de área Ki67 positiva) respecto a los de los ratones *wt* (figura R.15B). Estos datos confirman *in vivo* el papel de APRIL como promotor de la proliferación celular en cáncer de mama obtenido previamente *in vitro*.



**Figura R.15-** Análisis de la expresión de APRIL humano y Ki67 en tumores 4T1. **A)** Fotos representativas de la doble tinción realizada por inmunohistoquímica para detectar APRILh (azul) y Ki67 (rojo) en cortes de tumores 4T1 procedentes de ratones *wt* (n=9) y APRIL-Tg (n=7). **B)** Cuantificación del porcentaje de área de expresión de Ki67 dentro del tumor. Cada punto representa el valor medio de 20 campos procedentes de un mismo tumor; se indica también la media y la desviación estándar entre los distintos tumores analizados. Test *T-student*,  $p=0,02$

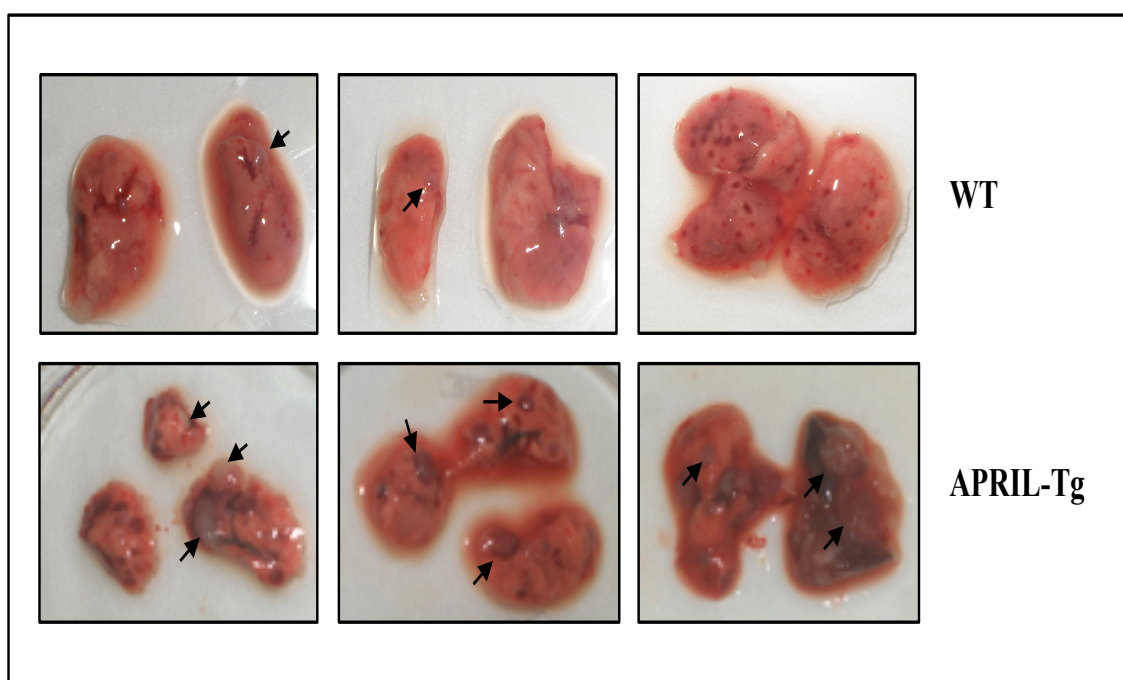
#### 4.1.1.1- La metástasis pulmonar se favorece en presencia de *APRIL*

La metástasis es un proceso que tiene lugar cuando las células tumorales se separan de la masa del tumor primario e invaden órganos distantes del mismo, donde



son capaces de sobrevivir y proliferar (Hanahan y Weinberg 2011). Cuando estas células tumorales escapan del tumor primario no siempre van directamente a los órganos donde originaran las futuras metástasis, sino que a veces se diseminan en otros microambientes, donde se concentran y son capaces de adquirir mutaciones que incrementan su capacidad metastásica. El principal lugar propuesto como sitio de paso intermedio antes de la colonización de los futuros órganos metastáticos han sido los nódulos linfáticos (Sleeman 2000). Después de los nódulos linfáticos, uno de los principales órganos de colonización metastásica en el cáncer de mama es el pulmón.

Para investigar si la citoquina APRIL participa en el proceso de metástasis, comenzamos haciendo un análisis macroscópico de los pulmones de los ratones APRIL-Tg y *wt* (n=6 en ambos grupos) inoculados con células 4T1. La figura R.16 muestra imágenes de los pulmones extraídos tras el sacrificio de los animales (día 32 post-inoculación) y pone de manifiesto el peor aspecto y la presencia de macro metástasis mas grandes en los pulmones de los ratones APRIL-Tg que en el grupo control.



**Figura R.16- Análisis macroscópico de los pulmones de ratones inoculados con células 4T1.** Una vez sacrificados los ratones a los 32 días post-inyección de las células, se extirparon los pulmones para su estudio. Fotos representativas de los pulmones de 1 experimento (n=4). 3 *wt* y 3 APRIL-Tg.

#### 4.1.1.2- *La presencia de APRIL varía la composición del infiltrado tumoral*

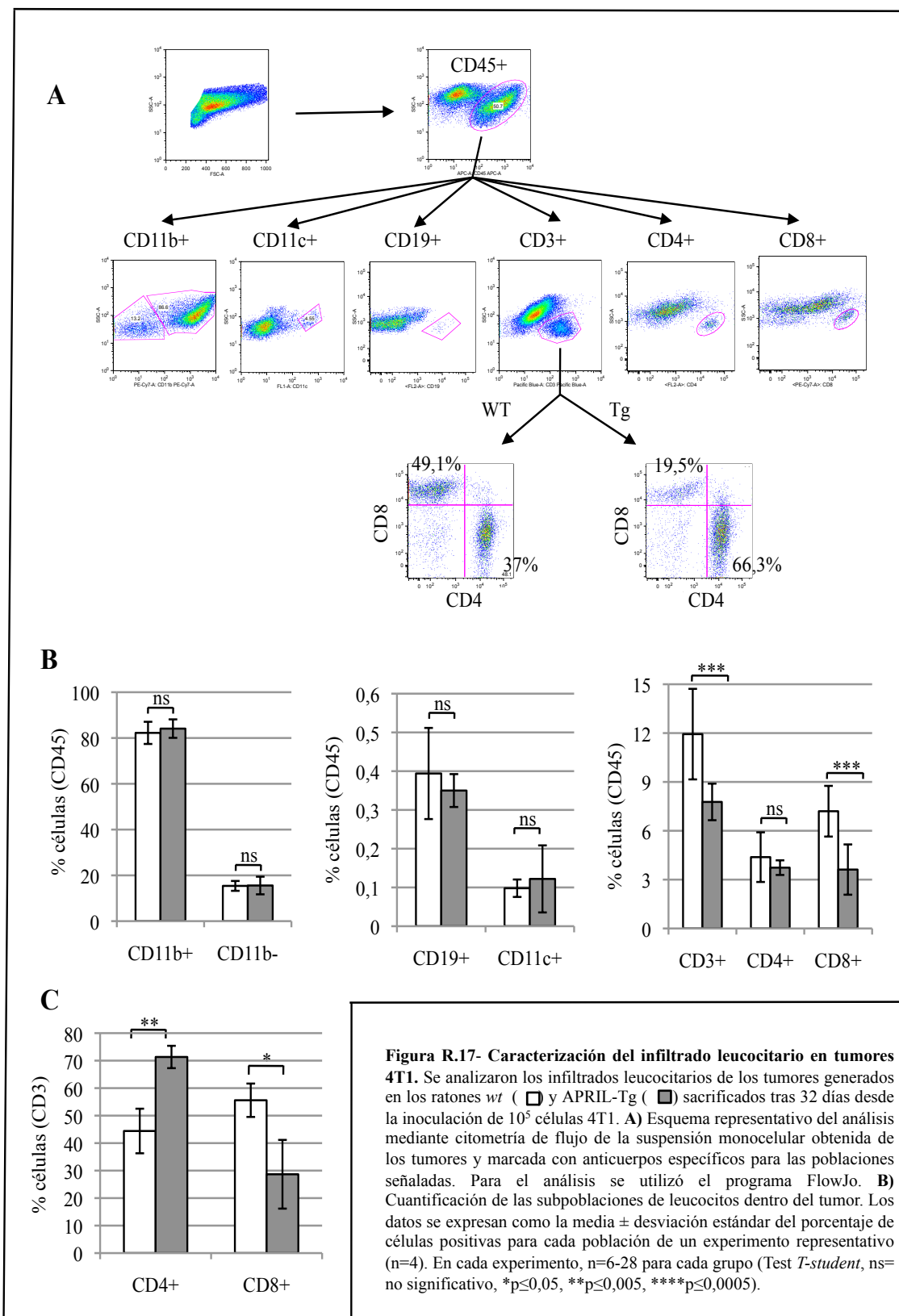
El sistema inmune juega un papel importante en el cáncer, pero su aportación al desarrollo de la enfermedad es compleja debido a los efectos de los diferentes tipos celulares que forman parte de él y que infiltran el tumor (DeNardo y Coussens 2007). El sistema inmune utiliza células especializadas (linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK, células mieloides...) para orquestar una respuesta eficaz que intente controlar el crecimiento tumoral, mientras que el tumor desarrolla diversas estrategias para escapar de este estricto control. Las células mieloides que infiltran el tumor secretan factores clave para el desarrollo de la respuesta inmune y son sensibles a la acción de las células tumorales. APRIL es una citoquina estrechamente relacionada con el sistema inmune, producida por varias poblaciones mieloides como son las células dendríticas, los macrófagos y los neutrófilos (Planelles y col. 2008). Por tanto, decidimos evaluar el efecto de la sobre-expresión de APRIL sobre el infiltrado tumoral en el modelo de ortotransplante 4T1.

Mediante citometría de flujo, caracterizamos el infiltrado leucocitario de los tumores 4T1. Para ello, obtuvimos una suspensión monocelular de los mismos y la marcamos con anticuerpos específicos que nos permitieron analizar las diferentes poblaciones leucocitarias que infiltraban los tumores: células mieloides (CD11b), células dendríticas (CD11c), células T (CD3), células B (CD19).

El primer paso fue analizar el porcentaje de leucocitos que infiltran el tumor. En la figura R.17B se aprecia que aproximadamente la mitad de las células que componen el tumor se corresponden con leucocitos infiltrantes, siendo este porcentaje de células CD45+ similar en ambos grupos de ratones (n=6) ( $53,75 \pm 8,82\%$  y  $53,98 \pm 9,42\%$  en ratones *wt* y APRIL-Tg respectivamente). Centrándonos en las células CD45+, la población mayoritaria son las células mieloides (CD11b+), tal y como se ha descrito previamente en este modelo tumoral (DuPre y col. 2007)). La figura R.17B muestra que el porcentaje de células CD11b+ es similar en ratones *wt* y APRIL-Tg ( $82,24 \pm 4,84\%$  y  $84,10 \pm 4,03\%$  respectivamente). Igual ocurre con las células dendríticas (CD11c+) y los linfocitos B (CD19+), que son poblaciones minoritarias dentro del tumor 4T1, y se encuentran en porcentajes similares en ratones *wt* y APRIL-Tg ( $0,10 \pm 0,023\%$  y  $0,12 \pm$

0,09% de células dendríticas y  $0,39 \pm 0,12\%$  y  $0,35 \pm 0,04\%$  de linfocitos B en ratones *wt* y APRIL-Tg respectivamente; test *T-student*  $p=0,583$  y  $p=0,5$  para las poblaciones CD11c+ Y CD19+ respectivamente) (figura R.17A y 17B). Sin embargo, como muestra la figura R.17B, cuando analizamos la población de células T (CD3+), vemos una reducción significativa del porcentaje de la misma en los tumores 4T1 de los ratones APRIL-Tg ( $n=14$ ) en comparación con los de los *wt* ( $n=28$ ) (APRIL-Tg:  $7,77 \pm 1,12\%$ ; *wt*:  $11,94 \pm 2,78\%$ ;  $p=2,89 \times 10^{-9}$ ).

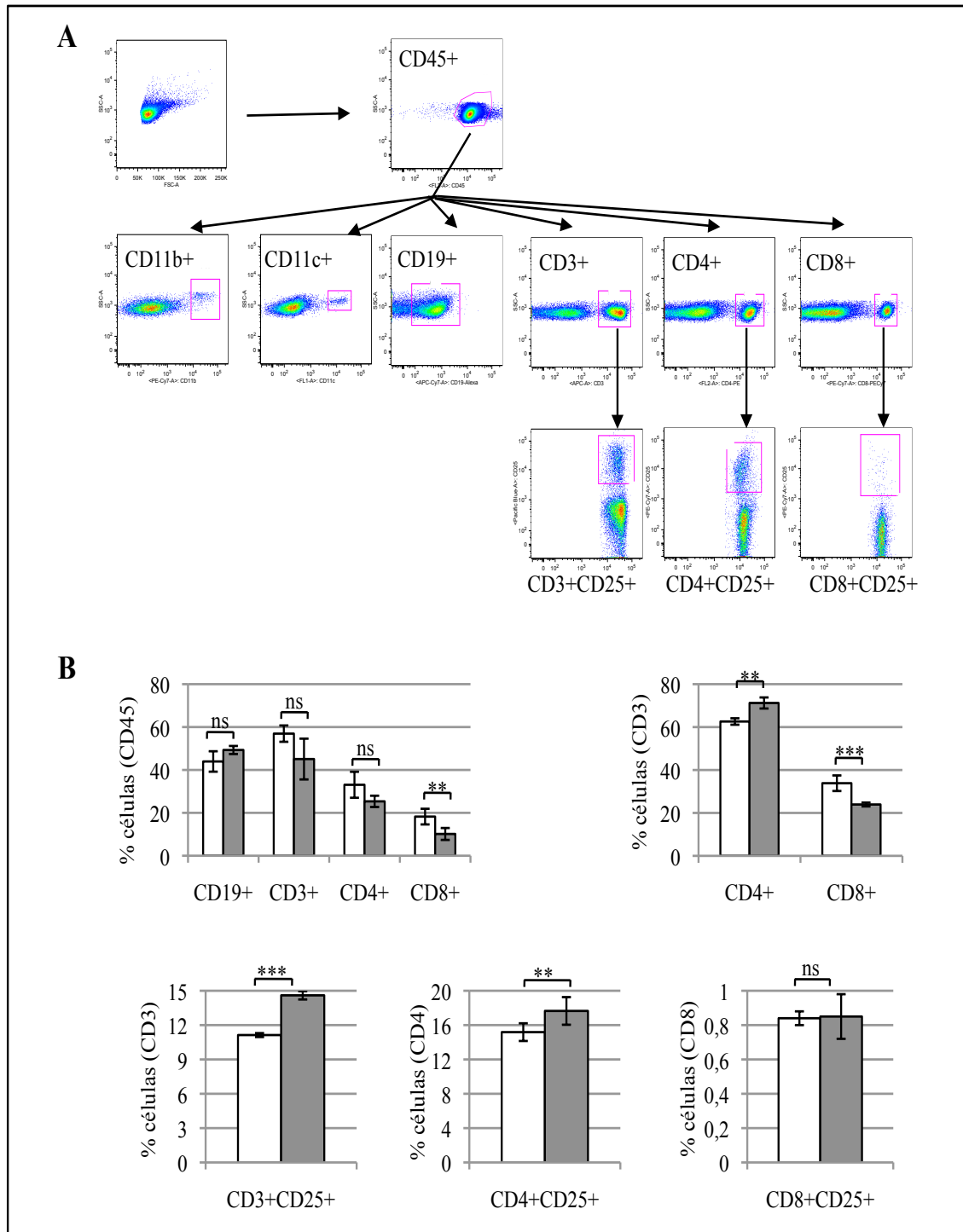
A continuación, caracterizamos la población de los linfocitos T CD3+ analizando las subpoblaciones CD4+ y CD8+ en el infiltrado tumoral y como muestra la figura R.17 vimos una reducción significativa en el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los ratones APRIL-Tg ( $n=19$ ) respecto de los *wt* ( $n=10$ ) ( $3,62 \pm 1,54\%$  y  $7,20 \pm 1,56\%$  respectivamente; test *T-student*,  $p=1,45 \times 10^{-6}$ ) (figura R.17A y R.17B), mientras que en los linfocitos T CD4+ no se apreciaban grandes diferencias ( $3,74 \pm 0,45\%$  y  $4,38 \pm 1,53\%$  en ratones APRIL-Tg ( $n=6$ ) y *wt* ( $n=13$ ) respectivamente; test *T-student*,  $p=0,18$ ) (figura R.17A y R.17B). El análisis de los linfocitos T CD4+ y CD8+ referido a la población T CD3+ mostró un cambio significativo en la distribución de las poblaciones (figura R.17C), ya que disminuye el porcentaje de linfocitos CD8+ en los tumores de los ratones APRIL-Tg ( $28,67 \pm 12,5\%$ ) respecto al de los tumores de los *wt* ( $55,59 \pm 6,07\%$ ; ,  $p=0,0197$ ) y aumenta por tanto el de las T CD4+ (APRIL-Tg:  $71,33 \pm 4,06\%$ ; *wt*:  $44,41 \pm 8,11\%$ ;  $p=0,0019$ ).



Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son una de las poblaciones clave en la respuesta anti-tumoral del sistema inmune y se activan inicialmente en los nódulos linfáticos cercanos al tumor. Por eso realizamos en nuestro modelo tumoral 4T1, el análisis de las poblaciones T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los nódulos linfáticos que drenaban el tumor (figura R.18A y 18B). Las diferencias obtenidas en cuanto al infiltrado en el tumor, se repitieron en los nódulos linfáticos, poniéndose de manifiesto una menor cantidad de células T-CD3 y T-CD8 positivas, en los ratones APRIL-Tg (figura R.18B).

En primer lugar, al analizar la población CD3<sup>+</sup>, vemos una disminución en el porcentaje de las misma en los nódulos de los tumores 4T1 de ratones APRIL-Tg en comparación con los *wt* ( $56,93 \pm 3,8\%$  y  $45,08 \pm 9,51\%$  respectivamente; test *T-student*  $p=0,082$ ) (figura R.18A y R.18B). A continuación analizamos las distintas subpoblaciones de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> dentro del nódulo linfático, donde vimos una reducción significativa (test *T-student*  $p=0,0049$ ) en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en los ratones APRIL-Tg ( $10,15 \pm 2,78\%$ ) respecto de los *wt* ( $18,24 \pm 3,65\%$ ) (figura R.18B, primera gráfica de la parte superior). El análisis de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> referido a la población T CD3<sup>+</sup> mostró un cambio significativo en la distribución de ambas poblaciones (figura R.18B, segunda gráfica de la parte superior), ya que disminuye de manera significativa (test *T-student*,  $p= 0,00003$ ) el porcentaje de linfocitos CD8<sup>+</sup> en los nódulos de los ratones APRIL-Tg ( $23,93 \pm 0,9\%$ ) respecto al de los nódulos de los ratones *wt* ( $33,84 \pm 3,63\%$ ), y consecuentemente aumenta el de las T CD4<sup>+</sup> (APRIL-Tg:  $71,23 \pm 2,58\%$ ; *wt*:  $62,6 \pm 1,5\%$ ; test *T-student*  $p=0,0024$ ). Analizamos también la expresión del marcador de activación CD25 en las células CD3<sup>+</sup>, y obtuvimos que la proporción de células T activadas CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> es significativamente mayor (test *T-student*,  $p= 0,00004$ ) en los ratones que sobre-expresan la citoquina ( $14,6 \pm 0,36\%$ ) que en los ratones control ( $11,13 \pm 0,17\%$ ) (figura R.18B, primera gráfica de la parte inferior). De manera interesante, la proporción de células CD4 activadas (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) es significativamente mayor en ratones APRIL-Tg que en ratones control ( $17,65 \pm 1,61\%$  y  $15,18 \pm 1,03\%$  respectivamente; test *T-student*  $p=0,045$ ). A la vista de estos resultados, parece estar ocurriendo que la sobre-expresión de APRIL favorece la activación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> (mayor proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en ratones APRIL-Tg), y aunque no lo hemos confirmado, estas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> posiblemente sean linfocitos T reguladores (Treg), lo cual

explicaría la menor proporción de linfocitos CD8+ presentes en los animales APRIL-Tg.



**Figura R.18- Caracterización celular de los nódulos linfáticos drenantes de tumores 4T1.** Se analizó la composición de los nódulos linfáticos drenantes de los tumores 4T1 generados en los ratones wt (□) y APRIL-Tg (■) sacrificados tras 32 días desde la inoculación de  $10^5$  células 4T1. **A)** Esquema representativo del análisis mediante citometría de flujo de las distintas poblaciones identificadas, utilizando el programa FlowJo. **B)** Cuantificación de las poblaciones. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de células positivas para cada población y un experimento representativo (n=4). En cada experimento, n=6 animales por grupo (Test *T-student*, ns= no significativo, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , \*\*\* $p \leq 0,0005$ ).

#### ***4.2- APRIL favorece el crecimiento de tumores espontáneos de mama. Modelo BALB/c/MMTV/neu***

Además del modelo de ortotransplante tumoral de células 4T1, decidimos investigar la implicación de APRIL en el desarrollo espontáneo del cáncer de mama, utilizando el modelo MMTV-neu. En el laboratorio disponemos de los ratones MMTV-neu en fondo BALB/c, los cuales sobre-expresan el oncogen *neu* bajo la dirección del promotor MMTV en todas sus mamas y están genéticamente destinados a desarrollar una de las formas más agresivas del cáncer de mama, con una penetrancia del 100% en cada una de sus 10 mamas (Boggio y col. 1998, Calogero y col. 2007).

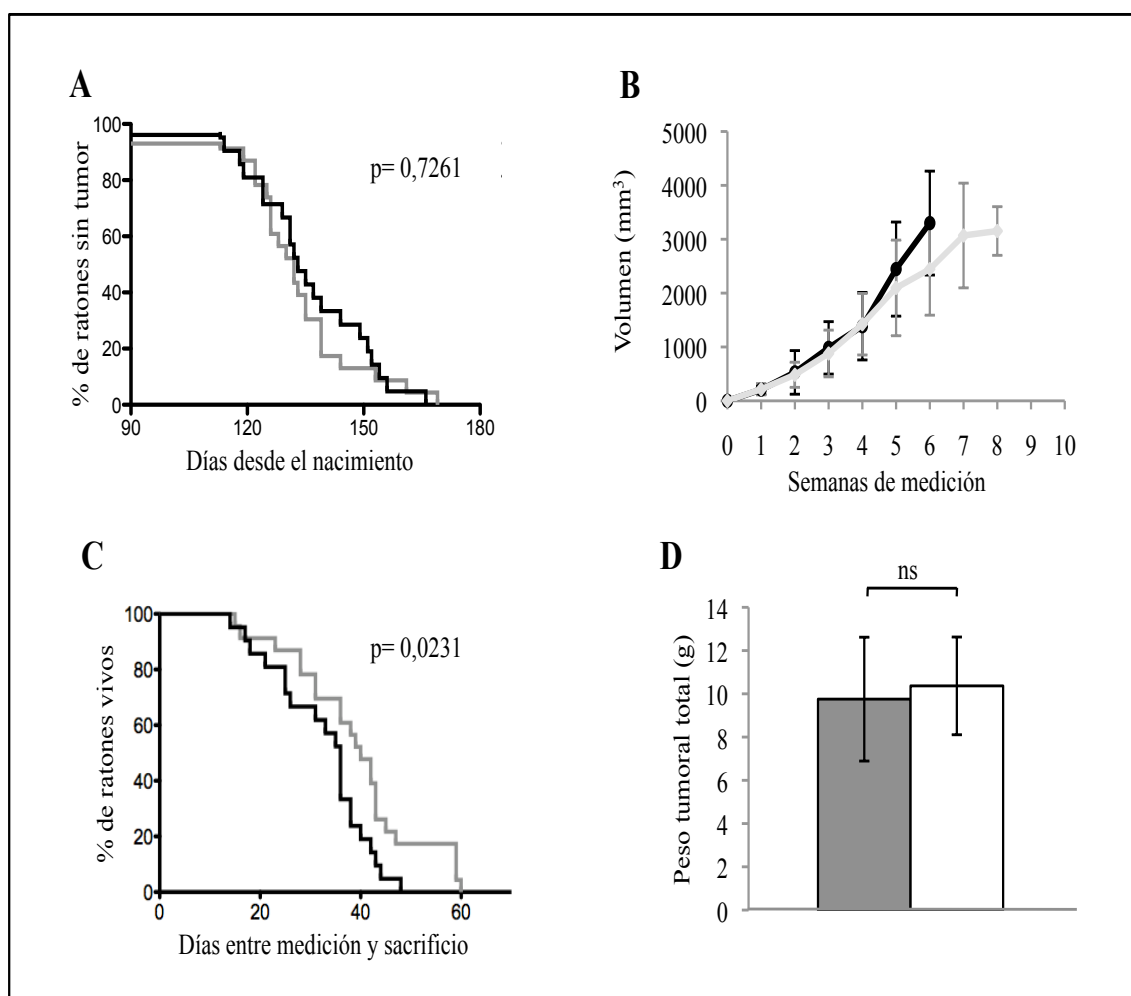
##### ***4.2.1- Influencia de la sobre-expresión de APRIL en el desarrollo espontáneo de tumores de mama en ratones. Modelo MMTV-neu/APRIL-Tg***

Generamos una colonia de ratones MMTV-neu que además sobre-expresaban la proteína APRIL (MMTV-neu/APRIL) y analizamos la aparición, multiplicidad y cinética de crecimiento tumoral, así como la supervivencia de los animales, comparándolos con los ratones MMTV-neu.

Se conoce que alrededor de la semana 16 uno o más tumores empiezan a ser palpables en las mamas de estos ratones (Husemann y col. 2008). Tomando esta observación como punto de partida, se comenzaron a palpar las mamas de las hembras de ambos genotipos a partir de las 12 semanas de edad. En la figura R.19A se muestra que no hay diferencias en la cinética de aparición de los tumores entre los ratones MMTV-neu/APRIL-Tg (n=21) y los ratones control MMTV-neu (n=23) (test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,7261$ ).

La evolución del crecimiento tumoral se representa en la figura R.19B y muestra que hay diferencias moderadas entre ambos grupos de ratones siendo puntualmente las diferencias significativas (sexta semana; MMTV-neu/APRIL-Tg:  $3.174,786\text{mm}^3$  MMTV-neu:  $2.444,982\text{mm}^3$ ; test *T-student*,  $p=0,044$ ). Como consecuencia del crecimiento acelerado de los tumores en los ratones MMTV-neu/APRIL-Tg, observamos un descenso significativo en el tiempo de vida media de los animales o supervivencia desde la aparición del tumor (Test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,0231$ ).

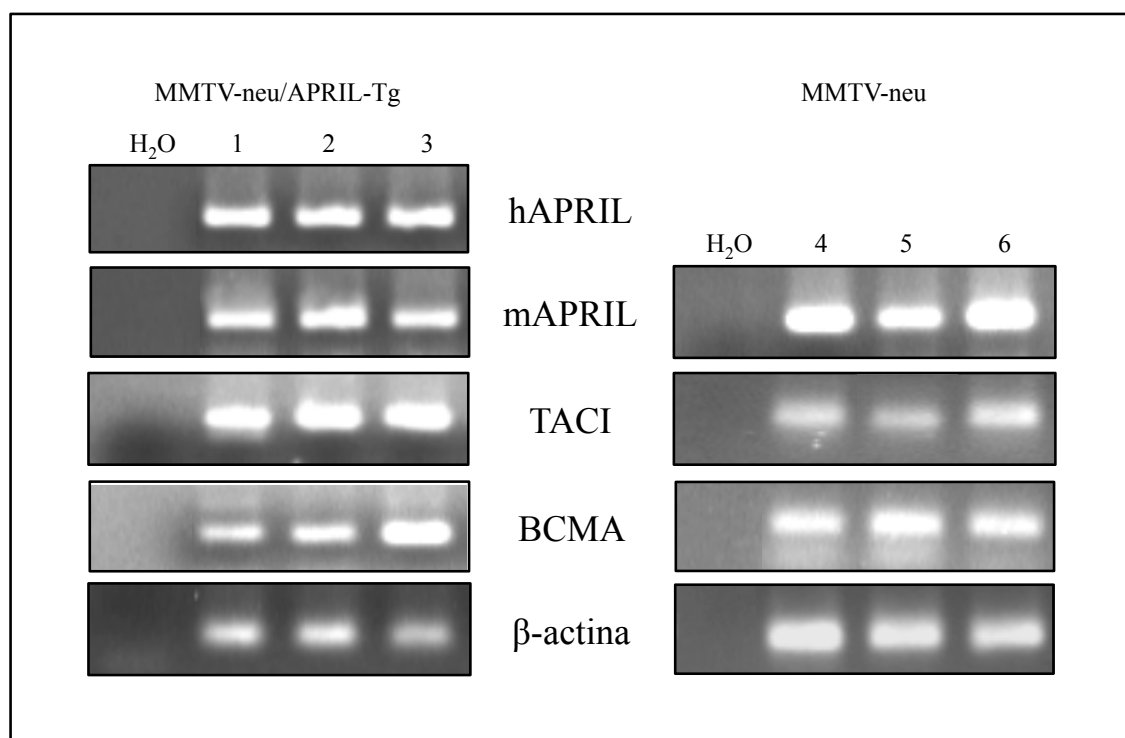
(figura R.19C). A día 38 post-medición, todos los ratones MMTV-neu/APRIL-Tg ya habían sido sacrificados, mientras que el 30% de los ratones MMTV-neu seguían vivos, algunos hasta 21 días más tarde (día=59). Como es de esperar, no hay diferencias entre ambos grupos, en el peso total de los tumores a tiempo final (MMTV-neu,  $10,37 \pm 2,26$  g,  $n=13$ ; MMTV-neu/APRIL-KO,  $9,76 \pm 2,86$ g,  $n=16$ ; test *T-student*,  $p=0,525$ ) (figura R.19D), lo que refleja la homogeneidad en el sacrificio de los animales. Estos resultados nos indican que la sobre-expresión de APRIL en el modelo MMTV-neu no influye de manera detectable en el inicio de la enfermedad, pero si acelera de manera notable el desarrollo de la misma, aumentando el crecimiento de los tumores y consecuentemente, disminuyendo la supervivencia de los ratones.



**Figura R.19- Análisis de la aparición y crecimiento tumoral y de la supervivencia en el modelo MMTV-neu/APRIL-Tg.** **A)** Cinética de aparición de los tumores representada como el porcentaje de ratones libres de tumor a lo largo del tiempo desde su nacimiento,  $n=21$  para ratones MMTV-neu/APRIL-Tg (■) y  $n=23$  para ratones MMTV-neu (□). Test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,7261$ . **B)** Progresión del volumen tumoral total. Cada punto representa la media del volumen ( $= (\text{ancho}^2 \times \text{largo}) / 2$ ) del tumor de todos los animales  $\pm$  desviación estándar;  $n=16$  en ambos grupos de ratones. **C)** Supervivencia de los ratones, desde la primera medición de los tumores, hasta su sacrificio, representada en una gráfica de Kaplan-Meier.  $n=15$  en ambos grupos de ratones. Test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,0231$ . **D)** Peso tumoral total. Después de sacrificar los animales, se extirparon y pesaron todos sus tumores. Los datos se expresan como la media del peso para todos los ratones  $\pm$  desviación estándar;  $n=16$  en ambos grupos de ratones.



Con el fin de investigar la relación entre el crecimiento de los tumores de los ratones MMTV-neu/APRIL y la citoquina, decidimos analizar la expresión de APRIL murina y humana en los tumores de los ratones MMTV-neu y MMTV-neu/APRIL. El análisis mediante RT-PCR semi-cuantitativa de las muestras de ARN obtenidas de los tumores puso de manifiesto la presencia del transgen humano *april* en las mamas tumorales de los ratones MMTV-neu/APRIL-Tg (figura R.20, primera fila). Además, cuando analizamos el gen *april* murino en los tumores, encontramos transcritos en las mamas tanto de los ratones MMTV-neu/APRIL-Tg como de los MMTV-neu (figura R.20, segunda fila). La detección de APRIL endógena en los tumores Neu sugiere la participación de la citoquina en este modelo tumoral y pone de manifiesto la limitación del modelo MMTV-neu/APRIL-Tg para investigar la implicación de APRIL en cáncer de mama.



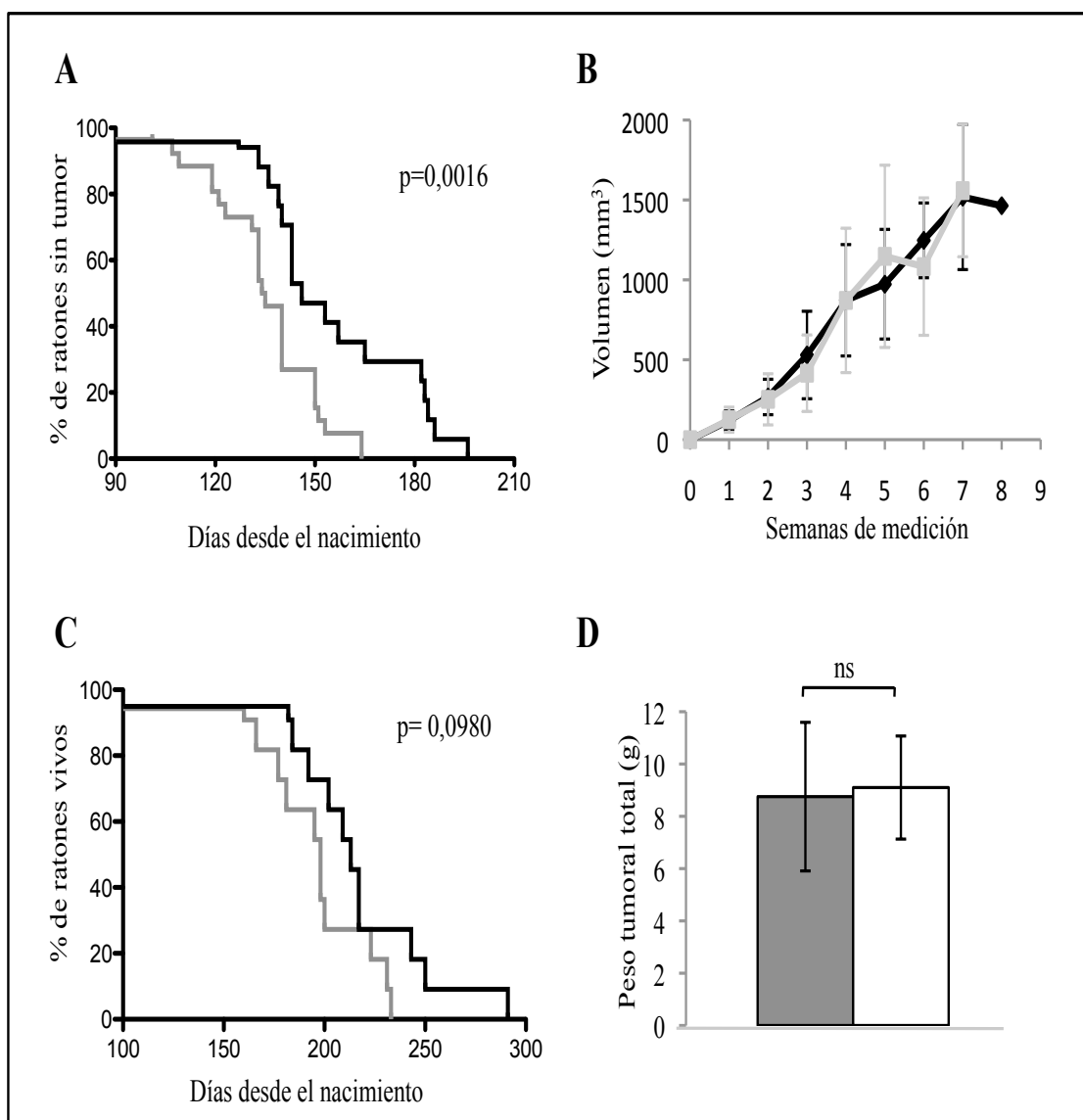
**Figura R.20- Expresión de APRIL, BCMA y TACI en las mamas tumorales de los ratones MMTV-neu/APRIL-Tg y MMTV-neu.** RT-PCR semi-cuantitativa. El ARN fue extraído y retrotranscrito de mamas tumorales procedentes de ratones MMTV-neu/APRIL-Tg y MMTV-neu (n=3). La figura muestra el producto de PCR amplificado específico para los genes: hAPRIL (humano), mAPRIL (murino), TACI (murino), BCMA (murino) y β-actina como control. Foto representativa de uno de los tres ensayos realizados.

#### **4.2.2- La ausencia de APRIL retrasa el desarrollo espontáneo de tumores de mama en ratones. Modelo MMTV-neu/APRIL-KO**

La presencia de ARNm de APRIL en las mamas de los ratones MMTV-neu, nos llevó a diseñar otra aproximación experimental, que consistió en investigar el desarrollo

espontáneo de tumores de mama en ausencia de APRIL. Para ello utilizamos los ratones APRIL-KO (Castigli y col. 2004) y generamos una colonia de animales transgénicos para neu y deficientes para APRIL (MMTV-neu/APRIL-KO). Previamente fue necesario cambiar el fondo genético de los ratones APRIL-KO de C57BL/6 a BALB/c, tal y como se detalla en la figura M.2 del apartado materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Los ratones MMTV-neu/APRIL-KO en fondo genético BALB/c comenzaron a ser analizados junto al grupo de animales control MMTV-neu correspondiente, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. El análisis de la aparición de los tumores (figura R.21A) muestra un retraso significativo en la aparición de los mismos en ausencia de APRIL, ya que a día 164 todos los ratones MMTV-neu (n=26) han sido sacrificados, mientras que un 30% de los ratones MMTV-neu/APRIL-KO (n=17) aun sobreviven (test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,0016$ ). Sin embargo, la ausencia de APRIL parece no afectar al crecimiento tumoral, al menos durante el tiempo en el que se realizó en el ensayo (no excluyéndose la posibilidad de observar algún efecto en semanas posteriores) tal y como indica la figura R.21B, donde se observa que los tumores de ambos grupos de ratones crecen de manera prácticamente paralela durante este periodo. El retraso en la aparición, junto con un crecimiento similar de los tumores, se traduce en una mayor supervivencia global (desde el nacimiento hasta el sacrificio) de los ratones MMTV-neu/APRIL-KO (n=11), ya que un 25% de los mismos siguen vivos a día 164, momento en el cual todos los ratones MMTV-neu (n=11) se han sacrificado (test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,098$ ) (figura R.21C). De nuevo, no encontramos diferencias entre los dos grupos en el peso total de los tumores tras el sacrificio, reflejo de la homogeneidad en el sacrificio de los animales ( $8,75 \pm 2,84\text{g}$  y  $9,35 \pm 1,95\text{g}$  en ratones MMTV-neu/APRIL-KO y MMTV-neu respectivamente; test *T-student*,  $p=0,598$ ) (figura R.21D).



**Figura R.21- Análisis de la aparición y crecimiento tumoral y de la supervivencia en el modelo MMTV-neu/APRIL-KO.** **A)** Cinética de aparición de los tumores representada como el porcentaje de ratones libres de tumor a lo largo del tiempo desde su nacimiento, n=16 para ratones MMTV-neu/APRIL-KO (■) y n=23 para ratones MMTV-neu (□). Test Log-rank (Mantel-Cox). **B)** Progresión del volumen tumoral total. Cada punto representa la media del volumen (= ancho<sup>2</sup> x largo/2) del tumor de todos los animales ± desviación estándar. **C)** Supervivencia global de los ratones según la gráfica de Kaplan-Meier; n=10 para ratones MMTV-neu/APRIL-KO y n=6 para ratones MMTV-neu. Test Log-rank (Mantel-Cox). **D)** Peso tumoral total. Después de sacrificar los animales, se extirparon y pesaron todos sus tumores. Los datos se expresan como la media del peso para todos los ratones ± desviación estándar; n=11 MMTV-neu/APRIL-KO y n=9 MMTV-neu. Test T-student p=0,598

Estos resultados indican que en el modelo de ratón MMTV-neu, la proteína APRIL promueve el desarrollo espontáneo de tumores de mama, tanto en la fase inicial como en la etapa posterior del crecimiento tumoral, y sugieren por tanto, que el bloqueo de APRIL puede ser una atractiva estrategia terapéutica.

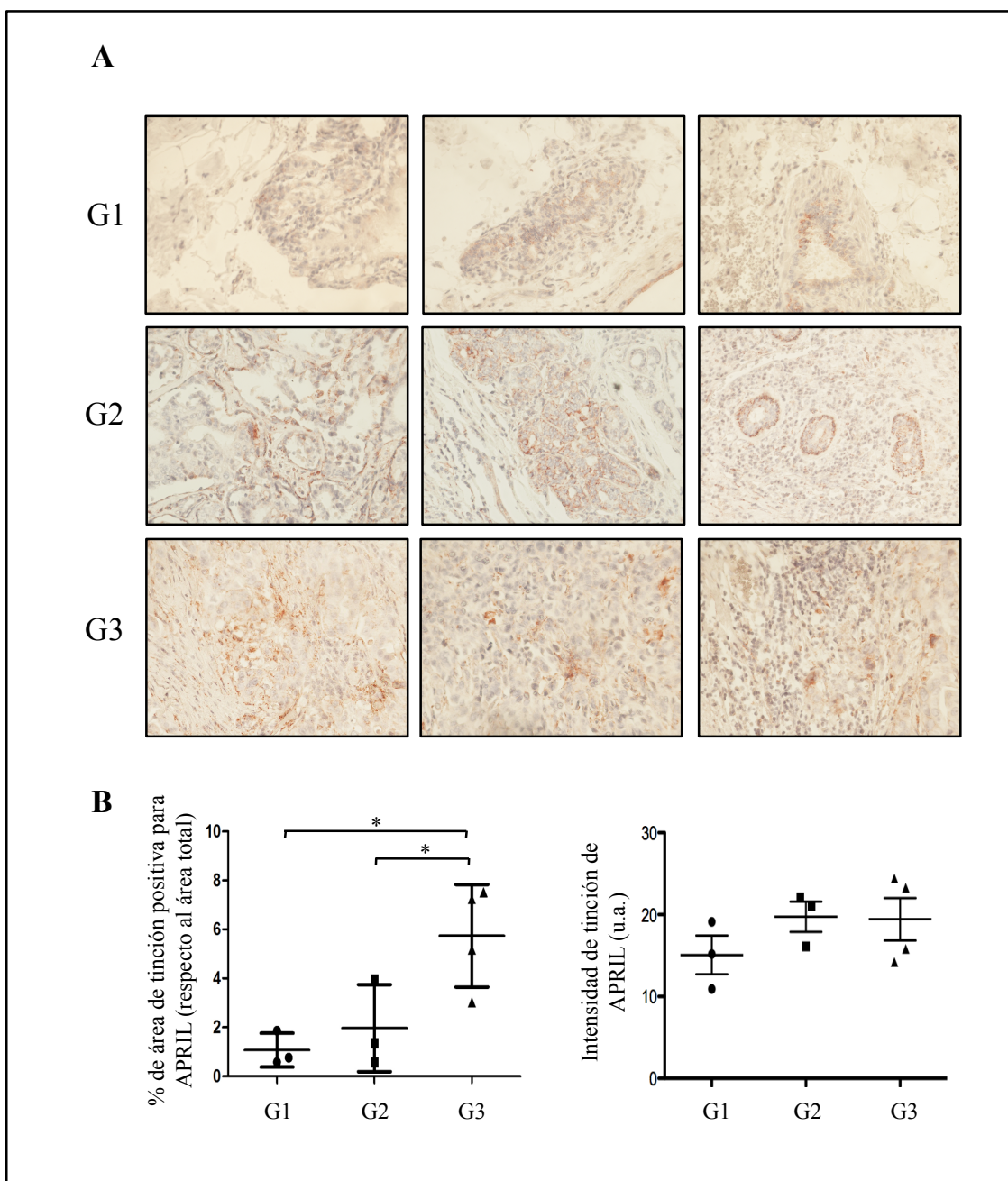
## 5- Análisis de la expresión de APRIL y sus receptores, BCMA y TACI en tumores primarios de mama

### *5.1- Tumores primarios de mama humanos de diferentes grados (I, II y III) expresan APRIL*

Hasta el momento, hay dos referencias en la literatura que relacionan la expresión de APRIL en tumores de mama con la progresión tumoral (Moreaux y col. 2009, Pelekanou y col. 2008), arrojando cada una de ellas con un mensaje diferente. El grupo de V. Pelekanou asocia la expresión de APRIL de manera inversa con el grado del tumor. Sin embargo, J. Moreaux y su grupo, asocian la expresión de APRIL de manera directa con la progresión tumoral.

Con el fin de generar nuevos datos que ayuden a clarificar este aspecto y a la espera de reunir un amplio grupo de muestras humanas de carcinoma de mama ( $n > 150$ ), analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión de APRIL en una batería de adenocarcinomas ductales de mama (disponibles en el grupo del Dr. Santos Mañes, CNB, Madrid). Utilizamos 18 muestras de diferente estadio clínico: 6 muestras de estadio I (T1, N0, M0), 6 de estadio II (T1-2, N0-1, M0) y 6 muestras de estadio III (T0-4, N0-3, M0).

La figura R.22A muestra unas fotos representativas de la expresión de APRIL en cada estadio tumoral en las que se aprecia una tinción mas abundante e intensa a medida que progresa el tumor. A pesar del pequeño número de muestras analizadas por estadio ( $n=6$ ), cuantificamos el marcaje y vimos que tanto la intensidad de la tinción como el porcentaje de área positiva para APRIL (10 campos/muestra) aumentan con la estadio tumoral (figura R.22B), lo que sugiere que los niveles de expresión de APRIL se relacionan de manera directa con la progresión de la enfermedad. No obstante, es necesario aumentar el número de muestras analizadas para dar solidez al resultado.



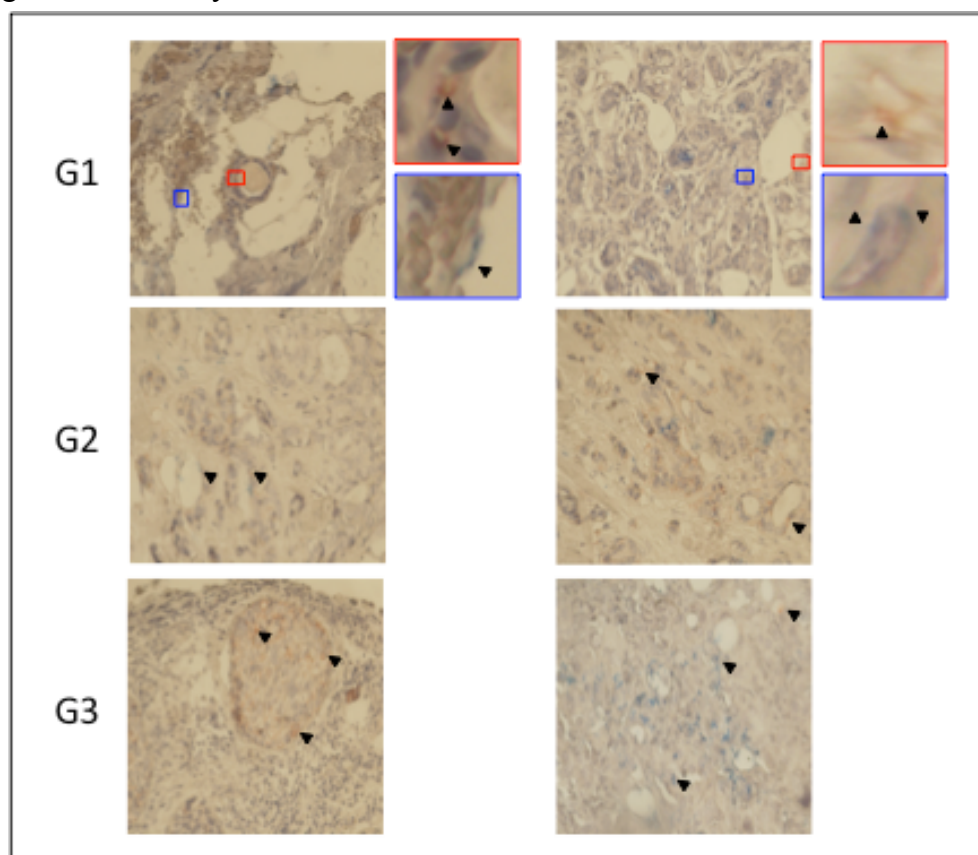
**Figura R.22- Expresión de APRIL en tumores humanos de mama.** **A)** Inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo frente a APRIL (rojo) y hematoxilina (azulado) en secciones histológicas de tejido de carcinoma de mama humano representativas de distintos estadios de evolución (grado 1, G1; grado 2, G2; y grado 3, G3). Test T-student,  $*p \leq 0,05$ . **B)** Cuantificación del porcentaje de área de expresión de APRIL dentro del tumor (a la izquierda) excluyéndose las áreas sin células. Cada punto representa el valor medio de 7 campos procedentes de un mismo tumor. A la derecha de la figura se encuentra la cuantificación de la intensidad de la expresión de APRIL, donde cada punto representa el valor medio de 10 campos procedentes del mismo tumor (G1, n=3; G2, n=3; G3, n=4); se indica también la media y la desviación estándar entre los distintos tumores.

### 5.2- Tumores primarios de mama de diferentes estadios (I, II y III) expresan BCMA y TACI

En la literatura apenas existen trabajos que describan la presencia de BCMA y TACI en tumores sólidos, probablemente debido a la ausencia de anticuerpos

adecuados. Hasta la fecha, solo hay una publicación de 2011, que muestra la expresión de las proteínas BCMA y TACI en tumores de origen renal (Pelekanou y col. 2011).

En el laboratorio teníamos una batería de anticuerpos frente a BCMA y TACI, algunos de los cuales detectaban correctamente los receptores en líneas celulares de cáncer de mama. Tras la puesta a punto, analizamos mediante inmunohistoquímica, la expresión de BCMA y TACI en la batería de 18 adenocarcinomas ductales de mama usada en el apartado anterior. La figura R.23 muestra unas fotos representativas de la expresión de BCMA y TACI en cada estadio tumoral. Los resultados indican que hay células positivas para BCMA y TACI en carcinoma de mama, aunque la expresión es baja y poco uniforme dentro del mismo tumor y no encontramos diferencias claras entre diferentes estadios tumorales. Debido al pequeño número de muestras disponibles y al deterioro de las mismas (bloques de parafina de más de 10 años), sería interesante diseñar un segundo análisis ampliando el grupo de estudio, con el fin de evaluar la expresión de los receptores BCMA y TACI en cáncer de mama y su correlación con la progresión tumoral y/o con otras variables de interés clínico.



**Figura R.23- Expresión de BCMA y TACI en tumores humanos de mama.** Inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo frente a TACI (rojo) y BCMA (azul) en secciones histológicas de tejido de carcinoma de mama humano, representativas de distintos estadios de evolución (grado 1, G1; grado 2, G2; grado 3, G3)







## **DISCUSIÓN**



APRIL es una proteína de la familia del TNF que se expresa principalmente en células del sistema inmune pero también en otros tipos celulares como son células epiteliales, osteoclastos y células madre (Kimberley y col. 2009). El estudio de las células B, las cuales expresan en su superficie los dos receptores para APRIL, ha proporcionado la mayor parte de la información disponible acerca las funciones biológicas de esta citoquina (Planelles y col. 2008), tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En diferentes tipos de leucemia y linfoma, APRIL se expresa y promueve la proliferación y supervivencia celular, a la vez que protege a las células de la apoptosis (Dillon y col. 2006). Además se han relacionado los niveles de APRIL en el suero con la progresión de un leucemia linfocítica crónica (Planelles y col. 2007) y su posible uso como factor pronóstico (Tecchio y col. 2011). En cáncer de mama y otros tipos de tumores sólidos hay pocos datos hasta el momento sobre APRIL. Dos trabajos han descrito su expresión en tumores primarios de mama (Pelekanouy col. 2008, Moreaux y col. 2009), lo que sugiere la implicación de la citoquina en este cáncer epitelial. La falta de conocimiento acerca del papel de APRIL en tumores sólidos en general, y del cáncer de mama en particular, impulsaron nuestra investigación, con el objetivo de caracterizar la función de APRIL en el desarrollo, mantenimiento y progresión de la enfermedad y evaluar su posible utilidad clínica.

El uso de un panel de líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47-D y MCF-7) (tabla R.1) nos ha servido para caracterizar, mediante diversas técnicas, la expresión de APRIL y sus receptores, BCMA y TACI. Hemos descrito que todas las células tumorales expresan APRIL, y hemos comprobado su localización intracelular, polarizada, en una estructura que se asemeja al aparato de Golgi, donde esta citoquina es sintetizada y procesada (figura R.3). El perfil de expresión de APRIL que se observa en las distintas líneas celulares, no parece estar asociado con la agresividad o la capacidad de invasión celular, ya que diferentes líneas celulares muy invasivas, como son las células MDA-MB-468 y MDA-MB-231, presentan altos y bajos niveles de expresión de APRIL, respectivamente. Asimismo, tampoco vemos asociación entre la expresión de APRIL y la de los receptores hormonales de estrógenos (RE $\alpha$ ) y progesterona (RP), ya que encontramos células como las T47-D (RE $\alpha$ +, RP+) y las MDA-MB-468 (RE $\alpha$ -, RP-), con niveles de expresión de APRIL similares (figuras R.1 y R.2).

Al igual que ocurre con el ligando, hemos descrito que las cuatro líneas de carcinoma de mama analizadas expresan los dos receptores para APRIL, BCMA y TACI, siendo la expresión mayor en las células triple negativas MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (figura R.6). Este dato sugiere una asociación entre los niveles expresión de BCMA y TACI y la agresividad e invasividad de las células, que sería interesante evaluar en tumores primarios humanos. La existencia de varios receptores para un mismo ligando es un fenómeno extendido dentro de la familia del TNF (Aggarwal 2012), y APRIL no es ninguna excepción.

Por otra parte, hemos mostrado que APRIL promueve *in vitro* la proliferación de células de carcinoma de mama y en concordancia con los niveles de expresión de BCMA y TACI, son las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 las que proliferan más (figura R.7). De hecho, células epiteliales control MCF10, expresan los niveles mas bajos de receptores y no proliferan en respuesta a APRIL, sugiriendo que la transformación maligna podría estar regulando la expresión y/o señalización de los receptores de APRIL. La presencia de ligando y receptores en las mismas células tumorales hace pensar en un mecanismo autocrino, de modo que las células secretarían APRIL para favorecer su crecimiento celular. Los experimentos de silenciamiento de la proteína APRIL endógena así lo confirman (figura R.8). Además, experimentos de proliferación en ausencia de TACI ó BCMA ponen de manifiesto la participación de ambos receptores (figura R.9B). El efecto promotor de proliferación de APRIL que vemos en cáncer de mama, concuerda con el descrito en linfomas y leucemias (Planelles y col. 2008) y sugiere por tanto una función común que va más allá del tipo de cáncer.

En tumores de origen hematopoyético se han encontrado diferentes mecanismos moleculares responsables del efecto promotor de supervivencia y proliferación mediados por APRIL. En leucemias y linfomas, APRIL activa el factor de transcripción NFκB y las rutas de traducción de señales de las MAPKs, además de aumentar la síntesis de moléculas antiapoptóticas como Bcl2 y Bcl<sub>XL</sub> (Kimberley y col. 2009). En el cáncer de mama, nuestros resultados demuestran que APRIL rápidamente fosforila, y activa, a las MAPKs p38 y ERK1/2, así como a la proteína AKT (figura R.10), tres rutas de señalización frecuentemente involucradas en procesos tumorales. El uso de inhibidores químicos específicos de cada una de estas vías indica que las tres son

necesarias para que APRIL promueva la proliferación celular así como para el crecimiento basal de las células (figura R.11).

Los estudios en células B han aportado información sobre las vías de señalización activadas por cada uno de los receptores de APRIL. La unión del ligando a BCMA recluta diferentes TRAFs (1, 2 y 3) y activa la ruta de señalización de la MAPK p38 mientras que su unión a TACI recluta TRAF2, 5 y 6 y desencadena la activación de ERK1/2. Se ha descrito que los TRAFs 1 y 5 no se expresan de manera constitutiva en el cáncer de mama pero si los TRAFs 2, 3 y 6. Por tanto, si inferimos un comportamiento similar en las células de cáncer de mama, APRIL activaría p38 vía BCMA y TRAF 2, 3 y ERK1/2 a través de TACI y TRAF 2, 6, dos vías que favorecen la supervivencia y proliferación en el cáncer de mama (Thornton y col. 2009, Whyte 2009).

La inflamación crónica producida por la infección persistente de parásitos, bacterias y virus es uno de los motivos del desarrollo de determinados tipos de cáncer. El reconocimiento de estos microorganismos o de sustancias liberadas por ellos (PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos) provoca la activación de receptores RRP (receptores de reconocimiento de patrones), entre los que se encuentran los TLRs (Lin y col. 2007). Los TLRs se expresan principalmente en células del sistema inmune, aunque también se han detectado en células epiteliales y en tumores derivados del epitelio (Yu y col. 2008). La amplia distribución de ligandos endógenos para estos receptores, sugiere que la señalización mediada por ellos puede ser continuamente activada y contribuir así a la progresión tumoral (Huang y col. 2008). En células de carcinoma de mama, hemos visto que el ligando del TLR3, pIC, aumenta notablemente la expresión de APRIL (figura R.5). En cáncer, la señalización a través del TLR3 puede tener efectos antitumorales, inhibiendo la proliferación de las células tumorales o induciendo la apoptosis, y efectos protumorales, favoreciendo las reacciones inflamatorias que contribuyen a la formación de los tumores (Yu y col. 2008). El pIC es una molécula que imita una secuencia de ARN vírico de doble cadena, lo que sugiere que APRIL puede ser un factor importante en el proceso inflamatorio asociado al cáncer de origen vírico como el de cuello de útero (causado por el virus del papiloma humano, VPH) o el de faringe (provocado por el virus de Epstein-Barr, VEB), en los que sería interesante analizar el perfil de expresión de APRIL. Al contrario que ocurre en ratones,

donde en 1936 el Dr. John Joseph Bittner demostró la transmisión de un retrovirus (virus de Bittner, MMTV o factor de la leche), que provocaba cáncer de mama en las crías, a través de la leche materna (Bittner y col. 1936), en humanos, no existe en la actualidad una base experimental concluyente sobre la existencia de un factor viral en la génesis del cáncer de mama. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de ligandos endógenos del TLR3 en el entorno tumoral, como se han descrito para otros TLR, que puedan actuar sobre las células de cáncer de mama y promover la secreción de factores pro-tumorales, como el ligando APRIL.

Para investigar si APRIL estimula la proliferación tumoral *in vivo*, analizamos el crecimiento de células tumorales de mama 4T1, que expresan los receptores de APRIL (figura R.12B) en un contexto de sobre-expresión de la citoquina, usando los ratones APRIL-Tg. Las células 4T1 inyectadas de manera ortotópica en ratones APRIL-Tg crecen mas rápido que en los ratones control (figura R.14A) lo que se corresponde con una mayor expresión del marcador de proliferación Ki67 dentro del tumor (figura R.15). Además, el hecho de que APRIL circule por el torrente sanguíneo en los ratones APRIL-Tg y de que lo detectemos de manera abundante en el tumor 4T1 generado (figura R.13) lo señalan fuertemente como responsable del efecto observado, confirmandose *in vivo* los resultados obtenidos con las líneas celulares de carcinoma de mama *in vitro*.

El papel del sistema inmune en el cáncer es fundamental, ya que puede restringir o promover el desarrollo del tumor, dependiendo de los diferentes tipos celulares que forman parte de él y que infiltran el tumor (DeNardo y col. 2007). Dos de las poblaciones celulares que juegan un papel determinante son los linfocitos T CD4+ y T CD8+ (DeNardo y col. 2007). Los linfocitos CD8+ citotóxicos (LTCs), tienen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral mediante la liberación de sustancias al medio, como pueden ser granzimas y perforinas, que actúan de manera conjunta con los linfocitos Th1 CD4+ (*T helper 1*) sobre la célula tumoral, inhibiendo su crecimiento.

APRIL es una citoquina estrechamente relacionada con el sistema inmune (Planelles y col. 2008), por lo que decidimos analizar el infiltrado de los tumores 4T1 inducidos en ratones *wt* y APRIL-Tg. Encontramos una reducción en el porcentaje de linfocitos T (CD3+) en los tumores de los ratones que sobre-expresan APRIL (figura

R.17) que se corresponde con un descenso significativo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (LTC) (figura R.17). Además, los resultados indican que la generación y/o activación de los linfocitos en el nódulo linfático que drena el tumor se encuentra alterada en los ratones APRIL-Tg, ya que detectamos un cambio en la distribución de los linfocitos T, con un incremento del ratio CD4/CD8 respecto al observado en los ratones control. El incremento de la población T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en el nódulo drenante de los ratones APRIL-Tg sugiere que podrían ser células T reguladoras, conocidas por inhibir la proliferación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y favorecer el fenotipo protumoral, y es una posibilidad que estamos investigando actualmente. También es posible, que la reducción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el tumor sea debida a una inhibición *in situ* por parte de otras células del sistema inmune, tales como linfocitos CD4<sup>+</sup> Th2, linfocitos T reguladores (Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) o células mieloides supresoras. En cualquier caso, nuevos experimentos son necesarios para clarificar el efecto de APRIL sobre el infiltrado tumoral en el modelo 4T1 y el mecanismo subyacente.

Otro de los aspectos que quisimos evaluar usando los tumores 4T1 fue la metástasis pulmonar. Las células epiteliales de la glándula mamaria, debido a la inflamación crónica del microentorno, sufren una transformación neoplásica que requiere la remodelación de la matriz extracelular, reclutamiento de células inflamatorias, angiogénesis y linfoangiogénesis. El proceso de transformación hace que las células neoplásicas expresen receptores de quimioquinas, que les posibilitarán su migración e invasión hacia otros órganos donde podrán proliferar hasta llegar a formar una lesión metastásica (Muller y col. 2001). Cuando analizamos a nivel macroscópico los pulmones de los ratones APRIL-Tg y ratones *wt* tras la inyección de células 4T1, observamos como la sobre-expresión de APRIL favorece mayores metástasis pulmonares. La hipótesis inicial sería que APRIL, al igual que ocurre en el tumor primario, viaja por el torrente sanguíneo de los ratones APRIL-Tg y promueve la proliferación de las células en el nicho metastásico. Ahora estamos determinando el número de focos metastásicos y el área de los mismos para dar consistencia a nuestra observación inicial.

Además de estudiar los tumores inducidos 4T1, quisimos analizar la implicación de APRIL en el desarrollo espontáneo de tumores de mama y el abordaje experimental que utilizamos se basó en el modelo tumoral MMTV-neu, en el que se sobre-expresa el

oncogen *neu* en la mama de los ratones, una situación que ocurre en un 20-30% de los carcinomas de mama en humanos (Ursini-Siegel y col. 2007). La expresión de Neu se ha convertido en clínica en un marcador molecular importante, que condiciona el tratamiento terapéutico, ya que los pacientes Neu- no responden a la terapia hormonal convencional y deben ser tratados de manera específica.

El análisis de los ratones dobles transgénicos MMTV-Neu/APRIL-Tg generados a lo largo de esta tesis doctoral mostró, que si bien la sobre-expresión de APRIL no modifica la aparición de los tumores, si se observa un mayor crecimiento de los mismos y una menor supervivencia de los animales, con efectos significativos aunque moderados (figura R.19). La expresión de la proteína APRIL endógena en los tumores de los ratones MMTV-neu (figura R.20) sugiere su implicación en el desarrollo del carcinoma de mama en este modelo y cuestiona la utilidad del mismo para investigar la función APRIL. Por eso desarrollamos los ratones MMTV-neu/APRIL-KO, y los resultados obtenidos ponen de manifiesto la implicación de APRIL en la aparición así como en la supervivencia de los animales. En ausencia de APRIL, la aparición de los tumores se retrasa de manera significativa (figura R.21) (día 101 y 127 para ratones MMTV-neu y MMTV-neu/APRIL-KO respectivamente; test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,0016$ ) y en consecuencia, hay un aumento de la supervivencia global de los ratones (211 días en los ratones MMTV-neu/APRIL-KO frente a los 186 días, como media, de supervivencia en los ratones MMTV-neu, frente a; test Log-rank (Mantel-Cox),  $p=0,098$ ). Estos resultados proponen un papel para APRIL en el desarrollo tumoral del modelo MMTV-neu, que sería mas relevante en los estadios iniciales de la enfermedad. Ciertamente, resulta llamativo que la ausencia de APRIL no se refleje en un menor crecimiento tumoral, dado su papel inductor de proliferación. La razón podría ser un mecanismo compensatorio, a cargo de otras citoquinas y/o factores de crecimiento, hipótesis que queda por investigar.

Entre los mecanismos moleculares que podrían explicar la participación de APRIL en el proceso tumoral de los ratones MMTV-neu, el razonamiento inicial sobre el que vamos a trabajar, es que el factor de transcripción NF $\kappa$ B, el cual se activa tras la expresión del oncogen *neu* (Pianetti y col. 2001), puede ser el regulador principal de la expresión de APRIL, ya que se ha descrito recientemente que la sobre-expresión de NF $\kappa$ B aumenta la transcripción de la región promotora de APRIL (Xu y col. 2012).



Otro de los objetivos de esta tesis doctoral era trasladar nuestra investigación a la clínica, por lo que empezamos a analizar la expresión de APRIL y de sus receptores en cortes de tumores de mama humanos. Nuestros resultados iniciales, obtenidos tras el estudio inmuno-histoquímico, muestran la expresión de APRIL en carcinomas primarios de mama (figura R.22) y la correlacionan de manera directa con la progresión de la enfermedad, de acuerdo con lo descrito previamente en la literatura (Moreaux y col. 2009), sugiriendo que la expresión de APRIL podría ser consecuencia de la transformación maligna de las células, hipótesis que se vería apoyada por el hecho de que APRIL favorece la proliferación celular, característica indispensable para la transformación maligna de las células. Actualmente en el laboratorio estamos trabajando en el análisis de un grupo más numeroso de muestras ( $n > 150$ ) para ampliar y completar el estudio iniciado (colaboración con el Dr. Miguel Martín, Hospital Gregorio Marañón, Madrid).

La expresión de APRIL en el cáncer de mama, nos lleva a plantearnos su potencial utilidad en clínica. En otros tipos de tumores como la Leucemia Linfocítica Crónica, se han detectado niveles elevados de APRIL en el suero de los pacientes y se ha sugerido su utilidad como diagnóstico de la enfermedad (Planelles y col. 2007). En el cáncer de páncreas, un órgano que comparte la función de glándula exocrina con la glándula mamaria, también se ha encontrado una mayor expresión de APRIL (Wang y col. 2008) y se ha descrito que los niveles séricos de APRIL de pacientes con tumores pancreáticos pueden ser utilizados como factor de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, de forma aislada o en combinación con otros marcadores convencionales (Wang y col. 2011). El nivel de APRIL en el suero de los pacientes se correlaciona de manera directa y significativa con los niveles de marcadores (ACE y CA19.9) utilizados convencionalmente en el diagnóstico del carcinoma de páncreas, aumentando todos ellos de manera directa y significativa con la progresión de la enfermedad (Wang y col. 2011). Actualmente, en el cáncer de mama se tiende a un diagnóstico molecular, basado en la presencia de receptores hormonales, del receptor ErbB2 y de marcadores de proliferación, entre otros, para definir un tratamiento personalizado del paciente que minimice los efectos secundarios y mejore los resultados obtenidos y con ello, la calidad de vida de los pacientes. Nuestros datos describen la expresión de APRIL en tumores de mama y la relacionan de manera directa con la progresión de la enfermedad,

lo cual nos lleva a pensar en el potencial uso de APRIL como factor de diagnóstico de la enfermedad, junto con los marcadores utilizados en la actualidad.

En cuanto a la expresión de los dos receptores conocidos para APRIL en tumores sólidos, la información disponible es escasa hasta el momento, y solamente se ha detectado la presencia de TACI, pero no de BCMA, en tumores de origen renal (Pelekanou y col. 2011). Los resultados de la presente tesis doctoral indican que hay expresión de BCMA y TACI en carcinomas de mama (figura R.23), aunque a diferencia del ligando, que se detecta en todos los tumores primarios analizados (n=18), la expresión de ambos receptores sólo se observa en algunos de ellos. Además, dentro del tumor, la presencia de BCMA y/o TACI es minoritaria y heterogénea, siendo una baja proporción de células las que los expresan. A la espera de analizar un mayor número de muestras, la baja expresión de los receptores sugiere que tal vez los proteoglicanos estén participando en la captura del ligando. Se sabe que APRIL se une a los proteoglicanos de la superficie de células de diferentes carcinomas en los que no se ha encontrado expresión de BCMA ni de TACI (Mhaweche-Fauceglia y col. 2006). Además, utilizando bases de datos de microarrays, se ha visto la sobre-expresión del proteoglicano sindecan-1, en varios tipos de cáncer que también sobre-expresan APRIL, entre los que se encuentra el carcinoma de mama (Moreaux y col. 2009). No obstante, no se puede descartar que la baja detección de los receptores en nuestros experimentos, sea debida a la mala calidad de los anticuerpos en el mercado.

Los resultados de la presente tesis doctoral que demuestran tanto *in vitro* como *in vivo*, el papel de APRIL como promotor tumoral en el cáncer de mama, junto con el hecho de que los ratones deficientes para esta citoquina tienen un desarrollo normal del sistema inmune (Castigli y col. 2004, Varfolomeev y col. 2004), sugieren que el bloqueo de APRIL podría ser una buena estrategia terapéutica para inhibir el crecimiento y/o progresión de estos tumores.

Hasta la fecha, se han desarrollado moléculas antagonistas que tienen como diana tanto APRIL como BAFF (TACI-Fc, Atacicept) (Gatto y col. 2008, Nestorov y col. 2010) y que se encuentran en ensayos clínicos en fase I para enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) (Dall'Era y col. 2007) y en leucemia linfocítica crónica (Kofler y col. 2012). También se han desarrollado

antagonistas específicos para BAFF (Belimumab o Lymphostat-B) (Dennis y col. 2012), comercializado recientemente en 2011 bajo el nombre de Benlysta, para el tratamiento combinado de pacientes con LES. Sin embargo, el papel esencial de BAFF en el desarrollo normal de las células B, limita en gran medida el uso de estos fármacos de manera generalizada (Gross y col. 2001). Hasta la fecha, no existen en el mercado moléculas antagonistas específicas y selectivas para APRIL, aunque recientemente, en 2011, un grupo ha desarrollado dos anticuerpos monoclonales frente a la proteína APRIL humana (hAPRIL.01A y hAPRIL.03A) que bloquean de manera específica su unión a BCMA y TACI sin afectar a BAFF, e inhiben la activación y supervivencia de las células B tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones APRIL-Tg, además de inhibir la supervivencia de células tumorales de LLC *in vitro* (Guadagnoli y col. 2011).

En cáncer de mama, y a la vista de los resultados presentados en esta tesis doctoral, sería interesante investigar el uso terapéutico de los anticuerpos hAPRIL.01A y hAPRIL.03A en modelos murinos tumorales, con el fin de analizar si el bloqueo de APRIL reduce la tasa de proliferación y el crecimiento tumoral. Trasladándonos al humano, no esperamos que una terapia que bloquee la acción de APRIL sea suficiente para eliminar el tumor, sino que su uso combinado con otros tratamientos utilizados pueda mejorar los resultados obtenidos actualmente.



## **CONCLUSIONES**



- 1- APRIL se expresa en líneas celulares de cáncer de mama humanas, de manera independiente a la expresión de receptores hormonales o a la capacidad de invasión de las mismas.
- 2- Los receptores BCMA y TACI se expresan en líneas celulares de cáncer de mama humanas, observándose una relación directa entre los niveles de expresión y la agresividad de las mismas.
- 3- Un ligando de los TLRs, el pIC, estimula la producción de APRIL en líneas celulares humanas de carcinoma de mama.
- 4- La unión de APRIL a BCMA y TACI, promueve la proliferación de células humanas de cáncer de mama, a través de la activación de las MAPKs p38 y ERK1/2.
- 5- En un modelo de ortotransplante, los tumores 4T1 crecen más rápido en ratones que sobre-expresan APRIL, lo que se asocia con la presencia de la citoquina en el tumor así como con una mayor tasa de proliferación (Ki67).
- 6- La sobre-expresión de APRIL en ratones modifica la respuesta inmune generada tras la inducción de tumores 4T1, disminuyendo el porcentaje de células T CD8+ tanto en el infiltrado tumoral como en los nódulos linfáticos drenantes.
- 7- APRIL participa en el desarrollo espontáneo de tumores de mama del modelo MMTV-neu, ya que en su ausencia se retrasa la aparición y el crecimiento de los tumores, y se incrementa la supervivencia de los ratones.
- 8- Tumores de mama primarios de estadio I, II y III expresan las proteínas APRIL, BCMA y TACI. Los niveles de expresión de APRIL se correlacionan de manera directa con la progresión tumoral.





## **BIBLIOGRAFÍA**



Abe M, Kido S, Hiasa M, Nakano A, Oda A, Amou H, Matsumoto T (2006). BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **20**: 1313-1315.

Aggarwal BB (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology* **3**: 745-756.

Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* **119**: 651-665.

Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter, D. Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer cell* **6**: 17-32.

Arendt LM, Rudnick JA, Keller PJ, Kuperwasser C (2010). Stroma in breast development and disease. *Seminars in cell & developmental biology* **21**: 11-18.

Avery DT (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *Journal of Clinical Investigation* **112**: 286-297.

Barsky SH, Karlin NJ (2005). Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **10**: 249-260.

Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat AF, Bossen C, Schneider P, Huard B, Lambert PH, Siegrist CA (2008). APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* **111**: 2755-2764.

Bischof D, El Sawy SF, Mantchev G, Yoon J, Michels GE, Nilson A, Sutor SL, Platt JL, Ansell SM, von Bulow G, Bram RJ (2006). Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood* **107**: 3235-3242.

Bittner JJ (1936). Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science* **84**: 162.

Bombardieri M, Kam NW, Brentano F, Choi K, Filer A, Kyburz D, McInnes IB, Gay S, Buckley C, Pitzalis C (2011). A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. *Annals of the rheumatic diseases* **70**: 1857-1865.

Bonci D, Hahne M, Felli N, Peschle C, De Maria R (2004). Potential role of APRIL as autocrine growth factor for megakaryocytopoiesis. *Blood* **104**: 3169-3172.

Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, Melani C, Giovarelli M, Rossi I, Nanni P, De Giovanni C, Bouchard P, Wolf S, Modesti A, Musiani P, Lollini PL, Colombo MP, Forni G (1998). Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* **188**: 589-596.

Bossen C, Schneider P (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Seminars in immunology* **18**: 263-275.

Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, Scott ML, Maquelin A, Belnoue E, Siegrist CA, Chevrier S, Acha-Orbea H, Leung H, Mackay F, Tschopp J, Schneider P (2008). TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* **111**: 1004-1012.

Burjanadze M, Matthes T, McKee T, Passweg J, Huard B (2009). In situ detection of APRIL-rich niches for plasma-cell survival and their contribution to B-cell lymphoma development. *Histology and histopathology* **24**: 1061-1066.

Calogero RA, Cordero F, Forni G, Cavallo F (2007). Inflammation and breast cancer. Inflammatory component of mammary carcinogenesis in ErbB2 transgenic mice. *Breast cancer research : BCR* **9**: 211.

Cancro MP (2004). The BLyS family of ligands and receptors: an archetype for niche-specific homeostatic regulation. *Immunological reviews* **202**: 237-249.

Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS (2004). Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3903-3908.

Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, Jabara H, Geha RS (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *The Journal of experimental medicine* **201**: 35-39.

Casu B, Naggi A, Torri G (2010). Heparin-derived heparan sulfate mimics to modulate heparan sulfate-protein interaction in inflammation and cancer. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **29**: 442-452.

Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL (2011). 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **60**: 319-326.

Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatism* **44**: 1313-1319.

Chiu A, Xu W, He B, Dillon SR, Gross JA, Sievers E, Qiao X, Santini P, Hyjek E, Lee JW, Cesarman E, Chadburn A, Knowles DM, Cerutti A (2007). Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* **109**: 729-739.

Chu VT, Enghard P, Riemekasten G, Berek C (2007). In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol* **179**: 5947-5957.

Craxton A, Magaletti D, Ryan EJ, Clark EA (2003). Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood* **101**: 4464-4471.

- Dall'Era M, Chakravarty E, Wallace D, Genovese M, Weisman M, Kavanaugh A, Kalunian K, Dhar P, Vincent E, Pena-Rossi C, Wofsy D (2007). Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after atacicept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial. *Arthritis and rheumatism* **56**: 4142-4150.
- Day ES, Cachero TG, Qian F, Sun Y, Wen D, Pelletier M, Hsu YM, Whitty A (2005). Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* **44**: 1919-1931.
- Delehedde M, Seve M, Sergeant N, Wartelle I, Lyon M, Rudland PS, Fernig DG (2000). Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44MAPK phosphorylation and IkappaB degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **275**: 33905-33910.
- DeNardo DG, Coussens LM (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast cancer research : BCR* **9**: 212.
- Dennis GJ (2012). Belimumab: a BLyS-specific inhibitor for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Clinical pharmacology and therapeutics* **91**: 143-149.
- Deshayes F, Lapree G, Portier A, Richard Y, Pencalet P, Mahieu-Caputo D, Horellou P, Tsapis A (2004). Abnormal production of the TNF-homologue APRIL increases the proliferation of human malignant glioblastoma cell lines via a specific receptor. *Oncogene* **23**: 3005-3012.
- Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R, Heppner GH (1978). Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer research* **38**: 3174-3181.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**: 3279-3290.
- Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ (2006). An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nature reviews Drug discovery* **5**: 235-246.
- Dillon SR, Harder B, Lewis KB, Moore MD, Liu H, Bukowski TR, Hamacher NB, Lantry MM, Maurer M, Krejsa CM, Ellsworth JL, Pederson S, Elkon KB, Wener MH, Dall'Era M, Gross JA (2010). B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin. *Arthritis research & therapy* **12**: R48.
- Dimri G, Band H, Band V (2005). Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast cancer research : BCR* **7**: 171-179.
- Ding W, Wang J, Sun B, Ju S, Yuan H, Wang X, Wang Y, Wang H (2009). APRIL knockdown suppresses migration and invasion of human colon carcinoma cells. *Clinical biochemistry* **42**: 1694-1698.

- DuPre SA, Redelman D, Hunter KW, Jr. (2007). The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *International journal of experimental pathology* **88**: 351-360.
- Endo T, Nishio M,ENZLER T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, Karin M, Kipps TJ (2007). BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* **109**: 703-710.
- Furuya T, Koga M, Hikami K, Kawasaki A, Tsuchiya N (2011). Effects of APRIL (TNFSF13) polymorphisms and splicing isoforms on the secretion of soluble APRIL. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*.
- Gatto B (2008). Atacicept, a homodimeric fusion protein for the potential treatment of diseases triggered by plasma cells. *Curr Opin Investig Drugs* **9**: 1216-1227.
- Gras MP, Laabi Y, Linares-Cruz G, Blondel MO, Rigaut JP, Brouet JC, Leca G, Haguenauer-Tsapis R, Tsapis A (1995). BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. *International immunology* **7**: 1093-1106.
- Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish-Novak J, Foster D, Lofton-Day C, Moore M, Littau A, Grossman A, Haugen H, Foley K, Blumberg H, Harrison K, Kindsvogel W, Clegg CH (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* **404**: 995-999.
- Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R, Rixon M, Schou O, Foley KP, Haugen H, McMillen S, Waggie K, Schreckhise RW, Shoemaker K, Vu T, Moore M, Grossman A, Clegg CH (2001). TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity* **15**: 289-302.
- Guadagnoli M, Kimberley FC, Phan U, Cameron K, Vink PM, Rodermond H, Eldering E, Kater AP, van Eenennaam H, Medema JP (2011). Development and characterization of APRIL antagonistic monoclonal antibodies for treatment of B-cell lymphomas. *Blood* **117**: 6856-6865.
- Gupta M, Dillon SR, Ziesmer SC, Feldman AL, Witzig TE, Ansell SM, Cerhan JR, Novak AJ (2009). A proliferation-inducing ligand mediates follicular lymphoma B-cell proliferation and cyclin D1 expression through phosphatidylinositol 3-kinase-regulated mammalian target of rapamycin activation. *Blood* **113**: 5206-5216.
- Hahne M, Kataoka T, Schroter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, Schneider P, Bornand T, Holler N, French LE, Sordat B, Rimoldi D, Tschopp J (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *The Journal of experimental medicine* **188**: 1185-1190.
- Haiat S, Billard C, Quiney C, Ajchenbaum-Cymbalista F, Kolb JP (2006). Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* **118**: 281-292.

Han Q, Leng J, Bian D, Mahanivong C, Carpenter KA, Pan ZK, Han J, Huang S (2002). Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 pathway promotes urokinase plasminogen activator mRNA stability in invasive breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 48379-48385.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.

Hardenberg G, Planelles L, Schwarte CM, van Bostelen L, Le Huong T, Hahne M, Medema JP (2007). Specific TLR ligands regulate APRIL secretion by dendritic cells in a PKR-dependent manner. *European journal of immunology* **37**: 2900-2911.

Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, Rogier E, Madry C, Inoue J, Devergne O, Tsapis A (2000). TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* **165**: 1322-1330.

He B, Raab-Traub N, Casali P, Cerutti A (2003). EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol* **171**: 5215-5224.

He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A (2004). Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol* **172**: 3268-3279.

He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* **26**: 812-826.

He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, Shan M, Xiong H, Bussell JB, Chiu A, Puel A, Reichenbach J, Marodi L, Doffinger R, Vasconcelos J, Issekutz A, Krause J, Davies G, Li X, Grimbacher B, Plebani A, Meffre E, Picard C, Cunningham-Rundles C, Casanova JL, Cerutti A (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nature immunology* **11**: 836-845.

Hendriks J, Planelles L, de Jong-Odding J, Hardenberg G, Pals ST, Hahne M, Spaargaren M, Medema JP (2005). Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell death and differentiation* **12**: 637-648.

Heppner GH, Dexter DL, DeNucci T, Miller FR, Calabresi P (1978). Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. *Cancer research* **38**: 3758-3763.

Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM (2000). Nontransgenic models of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **2**: 331-334.

Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G (2008). "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clinical and Translational Oncology* **10**: 777-785.

Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H (2008). TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* **27**: 218-224.

Huard B, Schneider P, Mauri D, Tschopp J, French LE (2001). T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *J Immunol* **167**: 6225-6231.

Huard B, McKee T, Bosshard C, Durual S, Matthes T, Myit S, Donze O, Frossard C, Chizzolini C, Favre C, Zubler R, Guyot JP, Schneider P, Roosnek E (2008). APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *The Journal of clinical investigation* **118**: 2887-2895.

Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmuller G, Klein CA (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer cell* **13**: 58-68.

Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, Runyon S, Yan M, Yin J, Shriver SK, Gordon NC, Pan B, Skelton NJ, Kelley RF, Starovasnik MA (2005). Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *The Journal of biological chemistry* **280**: 7218-7227.

Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG, Qiang F, Gorelik L, Kalled SL, Acha-Orbea H, Rennert PD, Tschopp J, Schneider P (2005). Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *The Journal of experimental medicine* **201**: 1375-1383.

Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K (2005). Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome. *Journal of clinical immunology* **25**: 189-201.

Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, Mostowski H, Verthelyi D, Akkoyunlu M (2007). Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *European journal of immunology* **37**: 1785-1795.

Kelly K, Manos E, Jensen G, Nadauld L, Jones DA (2000). APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death. *Cancer research* **60**: 1021-1027.

Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, Ajchenbaum-Cymbalista F, Simonin PY, Feldblum S, Kolb JP (2004). Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* **103**: 679-688.

Kimberley FC, Hahne M, Medema JP (2009). "APRIL hath put a spring of youth in everything": Relevance of APRIL for survival. *Journal of cellular physiology* **218**: 1-8.

Kofler DM, Gawlik BB, Elter T, Gianella-Borradori A, Wendtner CM, Hallek M (2012). Phase 1b trial of atacicept, a recombinant protein binding BLyS and APRIL, in



patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **26**: 841-844.

Koyama T, Tsukamoto H, Miyagi Y, Himeji D, Otsuka J, Miyagawa H, Harada M, Horiuchi T (2005). Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* **64**: 1065-1067.

Laabi Y, Gras MP, Carbonnel F, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A (1992). A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *The EMBO journal* **11**: 3897-3904.

Lee SM, Jeon ST, Suk K, Lee WH (2010). Macrophages express membrane bound form of APRIL that can generate immunomodulatory signals. *Immunology* **131**: 350-356.

Lee YH, Ota F, Kim-Howard X, Kaufman KM, Nath SK (2007). APRIL polymorphism and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* **46**: 1274-1276.

Lentz VM, Hayes CE, Cancro MP (1998). Bcmd decreases the life span of B-2 but not B-1 cells in A/WySnJ mice. *J Immunol* **160**: 3743-3747.

Lin WW, Karin M (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation* **117**: 1175-1183.

Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nature immunology* **3**: 822-829.

Lobito AA, Gabriel TL, Medema JP, Kimberley FC (2011). Disease causing mutations in the TNF and TNFR superfamilies: Focus on molecular mechanisms driving disease. *Trends in molecular medicine* **17**: 494-505.

Lofstrom B, Backlin C, Pettersson T, Lundberg IE, Baecklund E (2011). Expression of APRIL in diffuse large B cell lymphomas from patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **38**: 1891-1897.

Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar JP, Hahne M (2001). Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO reports* **2**: 945-951.

Madry C, Laabi Y, Callebaut I, Roussel J, Hatzoglou A, Le Coniat M, Mornon JP, Berger R, Tsapis A (1998). The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *International immunology* **10**: 1693-1702.

Maia S, Pelletier M, Ding J, Hsu YM, Sallan SE, Rao SP, Nadler LM, Cardoso AA (2011). Aberrant expression of functional BAFF-system receptors by malignant B-cell precursors impacts leukemia cell survival. *PloS one* **6**: e20787.

- Malvezzi M, Arfe A, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E (2011). European cancer mortality predictions for the year 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **22**: 947-956.
- Manes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gomez-Mouton C, Jimenez-Baranda S, Garzon A, Lacalle RA, Harshman K, Ruiz A, Martinez AC (2003). CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *The Journal of experimental medicine* **198**: 1381-1389.
- Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A (2000). Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Current biology : CB* **10**: 785-788.
- Massacand JC, Kaiser P, Ernst B, Tardivel A, Burki K, Schneider P, Harris NL (2008). Intestinal bacteria condition dendritic cells to promote IgA production. *PloS one* **3**: e2588.
- Mhaweche-Fauceglia P, Kaya G, Sauter G, McKee T, Donze O, Schwaller J, Huard B (2006). The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions. *Journal of leukocyte biology* **80**: 697-704.
- Miller FR, Heppner GH (1979). Immunologic heterogeneity of tumor cell subpopulations from a single mouse mammary tumor. *Journal of the National Cancer Institute* **63**: 1457-1463.
- Montero JC, Ocana A, Abad M, Ortiz-Ruiz MJ, Pandiella A, Esparis-Ogando A (2009). Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PloS one* **4**: e5565.
- Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D, Li Y, Galperina O, Giri J, Roschke V, Nardelli B, Carrell J, Sosnovtseva S, Greenfield W, Ruben SM, Olsen HS, Fikes J, Hilbert DM (1999). BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* **285**: 260-263.
- Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, Quittet P, Reme T, Lugagne C, Moine P, Rossi JF, Klein B, Tarte K (2004). BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* **103**: 3148-3157.
- Moreaux J, Cremer FW, Reme T, Raab M, Mahtouk K, Kaukel P, Pantesco V, De Vos J, Jourdan E, Jauch A, Legouffe E, Moos M, Fiol G, Goldschmidt H, Rossi JF, Hose D, Klein B (2005). The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *Blood* **106**: 1021-1030.
- Moreaux J, Sprynski AC, Dillon SR, Mahtouk K, Jourdan M, Ythier A, Moine P, Robert N, Jourdan E, Rossi JF, Klein B (2009a). APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. *European journal of haematology* **83**: 119-129.

Moreaux J, Veyrune JL, De Vos J, Klein B (2009b). APRIL is overexpressed in cancer: link with tumor progression. *BMC cancer* **9**: 83.

Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, Yu GL, Aggarwal BB (1999). Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry* **274**: 15978-15981.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**: 50-56.

Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**: 105-115.

Nardelli B (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* **97**: 198-204.

Nestorov I, Papasouliotis O, Pena Rossi C, Munafo A (2010). Pharmacokinetics and immunoglobulin response of subcutaneous and intravenous atacicept in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of pharmaceutical sciences* **99**: 524-538.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell* **10**: 515-527.

Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Groom J, Sutton IJ, Xin C, Tangye SG, Kalled SL, Mackay F, Mackay CR (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* **173**: 807-817.

Ng LG, Ng CH, Woehl B, Sutherland AP, Huo J, Xu S, Mackay F, Lam KP (2006). BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. *European journal of immunology* **36**: 1837-1846.

Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, Kipps TJ (2005). Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* **106**: 1012-1020.

Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, Jelinek DF (2002). Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* **100**: 2973-2979.

Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, Harder B, Henderson K, Kindsvogel W, Gross, JA, Greipp PR, Jelinek DF (2004). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple

myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* **103**: 689-694.

O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, Lin LL, Mantchev GT, Bram RJ, Noelle RJ (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *The Journal of experimental medicine* **199**: 91-98.

Patel DR, Wallweber HJ, Yin J, Shriver SK, Marsters SA, Gordon NC, Starovasnik MA, Kelley RF (2004). Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. *The Journal of biological chemistry* **279**: 16727-16735.

Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, Darivianaki K, Sanidas E, Tsiftsis DD, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E (2008). Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. *BMC cancer* **8**: 76.

Pelekanou V, Notas G, Theodoropoulou K, Kampa M, Takos D, Alexaki VI, Radojicic J, Sofras F, Tsapis A, Stathopoulos EN, Castanas E (2011). Detection of the TNFSF members BAFF, APRIL, TWEAK and their receptors in normal kidney and renal cell carcinomas. *Anal Cell Pathol (Amst)* **34**: 49-60.

Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE (2001). Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* **20**: 1287-1299.

Place AE, Jin Huh S, Polyak K (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast cancer research : BCR* **13**: 227.

Planelles L, Carvalho-Pinto CE, Hardenberg G, Smaniotto S, Savino W, Gomez-Caro R, Alvarez-Mon M, de Jong J, Eldering E, Martinez AC, Medema JP, Hahne M (2004). APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer cell* **6**: 399-408.

Planelles L, Castillo-Gutierrez S, Medema JP, Morales-Luque A, Merle-Beral H, Hahne M (2007). APRIL but not BLyS serum levels are increased in chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of APRIL for survival. *Haematologica* **92**: 1284-1285.

Planelles L, Medema JP, Hahne M, Hardenberg G (2008). The expanding role of APRIL in cancer and immunity. *Current molecular medicine* **8**: 829-844.

Polyak K, Hu M (2005). Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **10**: 231-247.

Polyak K (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation* **117**: 3155-3163.

Prat A, Perou CM (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* **5**: 5-23.

Rennert P, Schneider P, Cachero TG, Thompson J, Trabach L, Hertig S, Holler N, Qian

F, Mullen C, Strauch K, Browning JL, Ambrose C, Tschopp J (2000). A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *The Journal of experimental medicine* **192**: 1677-1684.

Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V, Stohl W, Baker KP, Ullrich S, Nardelli B, Hilbert DM, Migone TS (2002). BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol* **169**: 4314-4321.

Roth W, Wagenknecht B, Klumpp A, Naumann U, Hahne M, Tschopp J, Weller M (2001). APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* **8**: 403-410.

Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Kojima H, Okumura K, Kobata T (2007). TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *European journal of immunology* **37**: 110-118.

Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **293**: 2111-2114.

Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *The Journal of experimental medicine* **189**: 1747-1756.

Schneider P (2001). Maturation of Marginal Zone and Follicular B Cells Requires B Cell Activating Factor of the Tumor Necrosis Factor Family and Is Independent of B Cell Maturation Antigen. *Journal of Experimental Medicine* **194**: 1691-1698.

Schwaller J, Schneider P, Mhawech-Fauceglia P, McKee T, Myit S, Matthes T, Tschopp J, Donze O, Le Gal FA, Huard B (2007a). Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* **109**: 331-338.

Schwaller J, Went P, Matthes T, Dirnhofer S, Donze O, Mhawech-Fauceglia P, Myit S, Huard B (2007b). Paracrine promotion of tumor development by the TNF ligand APRIL in Hodgkin's Disease. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **21**: 1324-1327.

Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* **18**: 279-288.

Shu HB, Hu WH, Johnson H (1999). TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *Journal of leukocyte biology* **65**: 680-683.

Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, Ng LG, MacKay F, Rao SP, Kalled SL,

Scott ML (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* **173**: 2331-2341.

Sleeman JP (2000). The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* **157**: 55-81.

Sobin LH, Hermanek P, Hutter RV (1988). TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new (1987) and the old editions. *Cancer* **61**: 2310-2314.

Stein JV (2002). APRIL modulates B and T cell immunity. *Journal of Clinical Investigation* **109**: 1587-1598.

Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Roschke V, Wu Y, Baker KP, Hilbert DM (2004). Inverse association between circulating APRIL levels and serological and clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* **63**: 1096-1103.

Streuli CH (2003). Cell adhesion in mammary gland biology and neoplasia. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **8**: 375-381.

Sukumar S, McKenzie K, Chen Y (1995). Animal models for breast cancer. *Mutation research* **333**: 37-44.

Szodoray P, Jonsson R (2005). The BAFF/APRIL system in systemic autoimmune diseases with a special emphasis on Sjogren's syndrome. *Scandinavian journal of immunology* **62**: 421-428.

Tan SM, Xu D, Roschke V, Perry JW, Arkfeld DG, Ehresmann GR, Migone TS, Hilbert DM, Stohl W (2003). Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**: 982-992.

Tecchio C, Nichele I, Mosna F, Zampieri F, Leso A, Al-Khaffaf A, Veneri D, Andreini A, Pizzolo G, Ambrosetti A (2011). A proliferation-inducing ligand (APRIL) serum levels predict time to first treatment in patients affected by B-cell chronic lymphocytic leukemia. *European journal of haematology* **87**: 228-234.

Thangarajh M, Masterman T, Rot U, Duvefelt K, Brynedal B, Karrenbauer VD, Hillert J (2005). Increased levels of APRIL (a proliferation-inducing ligand) mRNA in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **167**: 210-214.

Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, Hession C, Schneider P, Sizing ID, Mullen C, Strauch K, Zafari M, Benjamin CD, Tschopp J, Browning JL, Ambrose C (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* **293**: 2108-2111.

Thornton TM, Rincon M (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International journal of biological sciences* **5**: 44-51.

Treml LS, Carlesso G, Hoek KL, Stadanlick JE, Kambayashi T, Bram RJ, Cancro MP, Khan WN (2007). TLR stimulation modifies BLyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells. *J Immunol* **178**: 7531-7539.

Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ (2007). Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nature reviews Cancer* **7**: 389-397.

van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST (1999). Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *The Journal of biological chemistry* **274**: 6499-6506.

Varfolomeev E, Kischkel F, Martin F, Seshasayee D, Wang H, Lawrence D, Olsson C, Tom L, Erickson S, French D, Schow P, Grewal IS, Ashkenazi A (2004). APRIL-Deficient Mice Have Normal Immune System Development. *Molecular and cellular biology* **24**: 997-1006.

Vargo-Gogola T, Rosen JM (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews Cancer* **7**: 659-672.

Visvader JE (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & development* **23**: 2563-2577.

von Bulow GU, Bram RJ (1997). NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* **278**: 138-141.

von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* **14**: 573-582.

Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L (2003). Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 4227-4239.

Wallweber HJ, Compaa DM, Starovasnik MA, Hymowitz SG (2004). The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL. *Journal of molecular biology* **343**: 283-290.

Wang F, Chen L, Mao ZB, Shao JG, Tan C, Huang WD (2008). Lentivirus-mediated short hairpin RNA targeting the APRIL gene suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Oncology reports* **20**: 135-139.

Wang F, Chen L, Ding W, Wang G, Wu Y, Wang J, Luo L, Cong H, Wang, Y, Ju S, Shao J, Wang H (2011). Serum APRIL, a potential tumor marker in pancreatic cancer. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* **49**: 1715-1719.

Wang H, Marsters SA, Baker T, Chan B, Lee WP, Fu L, Tumas D, Yan M, Dixit VM, Ashkenazi A, Grewal IS (2001). TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nature immunology* **2**: 632-637.

Wang J, Ding W, Sun B, Jing R, Huang H, Shi G, Wang H (2012). Targeting of colorectal cancer growth, metastasis, and anti-apoptosis in BALB/c nude mice via APRIL siRNA. *Molecular and cellular biochemistry* **363**: 1-10.

Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F (2009). Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast cancer research : BCR* **11**: 209.

Wu Y, Bressette D, Carrell JA, Kaufman T, Feng P, Taylor K, Gan Y, Cho YH, Garcia AD, Gollatz E, Dimke D, LaFleur D, Migone TS, Nardelli B, Wei P, Ruben SM, Ullrich SJ, Olsen HS, Kanakaraj P, Moore PA, Baker KP (2000). Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS. *The Journal of biological chemistry* **275**: 35478-35485.

Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, Khare SD, Boone T, Kelley M, Theill LE, Colombero A, Solovyev I, Lee F, McCabe S, Elliott R, Miner K, Hawkins N, Guo J, Stolina M, Yu G, Wang J, Delaney J, Meng SY, Boyle WJ, Hsu H (2000). TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *The Journal of experimental medicine* **192**: 137-143.

Xu S, Lam KP (2001). B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. *Molecular and cellular biology* **21**: 4067-4074.

Xu J, Ding WF, Shao KK, Wang XD, Wang GH, Li HQ, Wang HM (2012). Transcription of promoter from the human APRIL gene regulated by Sp1 and NF-kB. *Neoplasma* **59**: 341-347.

Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, Harless S, Cancro M, Grewal IS, Dixit VM (2001a). Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Current biology : CB* **11**: 1547-1552.

Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, Tumas D, Grewal IS, Dixit VM (2001b). Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nature immunology* **2**: 638-643.

Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT (2005). B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol* **175**: 2814-2824.

Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, McCabe S, Qiu WR, Kornuc M, Xia XZ, Guo J, Stolina M, Boyle WJ, Sarosi I, Hsu H, Senaldi G, Theill LE (2000). APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nature immunology* **1**: 252-256.

Yu L, Chen S (2008). Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **57**: 1271-1278.



Zonca M, Mancheno-Corvo P, Delarosa O, Manes S, Buscher D, Lombardo E, Planelles L (2011). APRIL and BAFF Proteins Increase Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells Through Activation of Erk1/2 MAP Kinase. *Tissue engineering Part A*.



# **AGRADECIMIENTOS**



Bueno, parece que después de 5 años por fin ha terminado esta etapa de la tesis...y como siempre que termina una etapa, es bueno pararse a pensar en todo lo ocurrido. Y como dicen que “es de bien nacidos ser agradecidos”, también corresponde agradecer a la gente que ha estado junto a mí todo este tiempo, y de antemano pido perdón si se me olvida nombrar a alguien, porque, por suerte para mí, habéis sido muchos los que me habéis acompañado en esta aventura.

En primer lugar, tengo que agradecer a Lourdes el darme la oportunidad de haber formado parte de su grupo, y de poder hacer la tesis en un sitio como este. También, porque en mis comienzos me enseñó que es posible disfrutar haciendo ciencia...algo que ha sido muy importante a lo largo de estos años. Por supuesto, también agradecer a Santos el haberme acogido en su laboratorio, y el haber hecho de mí un componente más de su grupo.

Y como no, agradecer al resto de personas del 415, a los que están (Rosana, Emilia, Conchi (suerte en tu nueva etapa), Manu, Juan Carlos, Lorena, Douglas y Manuela), y a los que han estado (Sonia, Catarina, Donna, Andrea, Cristina, Nate...), porque todos ellos siempre han estado dispuestos a echarme una mano (aunque fuera al cuello...) cuando lo he necesitado y han contribuido a hacerme sentir como en casa. Mención especial a Noé...gracias por todas esas conversaciones y sabios consejos (incluso en la distancia), porque has sabido transmitirme esa tranquilidad que tantas veces he necesitado. Pero dentro del laboratorio hay dos personas a las que tengo que agradecer de manera especial, y son Ali (aunque ya no esté) y Rosa. A Ali, por todo lo aportado (a nivel profesional, pero mucho más a nivel personal), por tantos momentos compartidos (muchos buenos, pero también algunos malos...), por ofrecerme su casa allá donde esté...por todo eso y por mucho más, GRACIAS. Y me queda Rosa, y con ella voy a hacer mía una frase del gran Antoine de Saint-Exupéry, en “El Principito”, “...lo que embellece al desierto es que esconde un pozo de agua en algún lugar...”; gracias porque, sobre todo en esta última etapa, has sido “el pozo” que necesitaba para seguir en este “desierto” en el que se había convertido la tesis.

Pero no todos los agradecimientos se quedan dentro del laboratorio, ni mucho menos... Tendría que dar las gracias a tantas y tantas personas del DIO que, de una manera u otra, han contribuido a hacer mi estancia aquí más cómoda y agradable...pero

como no puedo nombrarlos a todos, me conformaré con dar algunos nombres. De manera especial, gracias a Antonio Terán, porque aunque me costó un tiempo “aprender a quererlo”, al final lo hice; porque es una persona que, a nivel personal, me ha ayudado mucho, y siempre ha tenido su despacho (que yo tantas veces he usado casi como “confesionario”) y su tiempo a mi disposición...Y como no podría ser de otra manera, gracias a todos los que habéis hecho posibles “las cañas de los miércoles”, porque ese era nuestro momento de desconectar de todo y pasarlo bien, de cargar las pilas para el resto de la semana, porque en muchos momentos me habéis hecho salir a flote. GRACIAS a Vicen (de Sella!), Javi (gracias por ayudarme a ir tachando días del calendario...), Albert, Carla, Gonzalo, María Tello, Laura, Rubén, Dimitri, Bea, Miriam, Ángeles...Gracias también a mis compis de desayuno: Eva, Sheila, Lola, Gloria...por hacerme más fácil empezar cada día con una sonrisa. Gracias también a Denise y a Toñi, por tanto tiempo “perdido” conmigo, por esas conversaciones que me ayudaban a desahogarme...Pero si hay alguien especial para mi en este departamento, fuera de mi laboratorio, esos son Abel, Pedro y Gema. GRACIAS a Abel, por tantas y tantas cosas compartidas (profesionales y personales), por haberme ayudado a levantarme cada vez que caía, porque a su lado, “la pequeña Araceli” se ha hecho grande. GRACIAS a Gema, por estar siempre con una sonrisa, dispuesta a todo cada vez que la he necesitado; porque ha hecho divertidos los viajes en tren hasta Cantoblanco, porque con ella he compartido muchos viajes, y ha sido mi maestra “japonesa”. Y a Pedro...mil GRACIAS por escuchar mis problemas, aun cuando tenías los tuyos propios, por estar siempre dispuesto a un café para hablar y desahogarnos; por toda la ayuda, compañía y apoyo desinteresados que siempre me has prestado.

Y tampoco me gustaría olvidarme del resto de personal del centro que, de una u otra manera, ha contribuido a sacar esta tesis hacia delante...a Lucio, por su ayuda con los ratones, porque es un placer escucharlo y aprender de su experiencia. A Raquel, por la paciencia que ha sabido tener conmigo y con mis exigencias con los ratones y por esos ratitos de conversación que siempre acababan arrancándome una sonrisa.

Pero no todo queda en el CNB y su gente, ya que en Jaén también hay muchas personas que me han ayudado a llegar hasta aquí, a las que he dejado de dedicarles tiempo por dedicárselo a la tesis, y que aún así, siguen estando a mi lado. Gracias a Gusi (por acogerme cuando llegué a Madrid, y por hacerme los comienzos lejos de casa más

fáciles y agradables), a Bea (por haberme aguantado durante todo un año en casa, porque sé que le he fallado en momentos importantes en su vida, pero aun así, me sigue queriendo...), a Uge (dos años viviendo conmigo no deben de ser nada fáciles...y tu los has aguantado como una campeona!!!), a Estrella y Alberto (por esas cenas en su casa, por las que he tenido la suerte de disfrutar, pero también por todas aquellas que me he perdido por estar lejos...), a Alfonso (por ese café de cada año en Navidad para ponernos al día de el resto del año, por saber escucharme...), a Gema y Jose... Y por último, a “mis Manolitos” Ismael y Juan Carlos, por haber estado a mi lado desde que estábamos en la universidad, porque aunque nuestros caminos se separaron, seguimos estando “cerca en la distancia”, porque seguís siendo un pilar fundamental en lo que soy, porque habéis sabido compartir vuestra sensatez y cordura conmigo...

GRACIAS a mis padres, Félix y Araceli, porque si no fuera por ellos no hubiera llegado hasta aquí, por apoyarme siempre en mis decisiones, aunque no estuvieran de acuerdo con ellas, por haber dejado que cometiera mis propios errores, y por hacerme aprender de ellos. Por haberme inculcado que, en la vida, no es necesario que nadie me regale nada, que con esfuerzo, trabajo y constancia es posible llegar muy alto...tal y como ellos han hecho. A mi hermano Félix, porque a su manera, siempre ha estado a mi lado y me ha apoyado. Y también, gracias al resto de mi familia, porque a pesar de no entender muy bien que es lo que hacía, siempre me preguntaban interesados como iba “eso de la tesis”. Y en esta ocasión especial no puedo olvidarme de aquellos que ya no están, de mi abuela Beni, que con alegría vio como yo empezaba ilusionada esta aventura de la tesis...y sé que desde donde quiera que esté, se alegrará de verme terminarla con éxito.

Y por último, gracias a ti, Antonio. Por los buenos y malos ratos de mi trabajo que has tenido que aguantar, porque siempre lo has hecho con una sonrisa. Por servirme de apoyo y haberme dado ánimo y fuerza cuando lo he necesitado. Por haber comprendido siempre el que llegara a casa cansada, desanimada y enfadada. Gracias por haber aguantado y entendido el que dejara de dedicarte tiempo a ti por dedicárselo a la tesis, por aguantar mis enfados y mis cambios de humor por culpa del trabajo....GRACIAS por estar a mi lado y compartirlo todo.

